



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**CENTRO DE CIÊNCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**THALISON VINÍCIUS GOMES DE LIMA**

**IMPLEMENTAÇÃO E MELHORIA CONTÍNUA DE CONTROLE DE  
QUALIDADE DE UM BIOFERTILIZANTE OBTIDO A PARTIR DA  
FERMENTAÇÃO DE RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DE BENEFICIAMENTO DO  
CAMARÃO**

**FORTALEZA**

**2025**

THALISON VINÍCIUS GOMES DE LIMA

IMPLEMENTAÇÃO E MELHORIA CONTÍNUA DE CONTROLE DE QUALIDADE DE  
UM BIOFERTILIZANTE OBTIDO A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DE RESÍDUOS DA  
INDÚSTRIA DE BENEFICIAMENTO DO CAMARÃO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Curso de Graduação em Biotecnologia da  
Universidade Federal do Ceará, como requisito  
à obtenção do título de Bacharel em  
Biotecnologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>: Dra.: Denise Cavalcante  
Hissa

Orientadora técnico - científico: Dra: Bella  
Giselly Torres Alves

FORTALEZA

2025

THALISON VINÍCIUS GOMES DE LIMA

IMPLEMENTAÇÃO E MELHORIA CONTÍNUA DE CONTROLE DE QUALIDADE DE  
UM BIOFERTILIZANTE OBTIDO A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DE RESÍDUOS DA  
INDÚSTRIA DE BENEFICIAMENTO DO CAMARÃO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Curso de Graduação em Biotecnologia da  
Universidade Federal do Ceará, como requisito  
à obtenção do título de Bacharel em  
Biotecnologia.

Aprovado em: 15/12/2025

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará

---

Profa. Dra. Marjory Lima Holanda Araújo (UFC)  
Universidade Federal do Ceará

---

Dra. Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento (UFC)  
Universidade Federal do Ceará

## DEDICATÓRIA

A Deus

Aos meus pais, Márcio e Alcione.

Ao meu irmão, Alyff.

A mim.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a Deus, por ter posto em meu coração a sede pela pesquisa e pela descoberta de novas coisas, além do privilégio de ser escolhido para traçar esse caminho, que apesar das barreiras, dificuldades e até desânimos, me deu forças para conseguir, mesmo com tantos obstáculos, obrigado Senhor por ter me ajudado até aqui. Agradeço aos meus pais Márcio e Alcione, que sempre me apoiaram em tudo que me propus a fazer, mesmo questionando os riscos e inseguranças, nunca me impediram de alcançar meus sonhos e batalhar por eles, agradeço a minha mãe que mesmo às vezes não entendendo do que eu estava falando, me ouvia e me motivava a continuar tentando e não desistir, saibam que esse sonho não é uma conquista só minha, mas de vocês também. Agradeço ao meu irmão Alyff, por todas as vezes que me tirou de casa quando estava estressado e com muita coisa na cabeça, pelas conversas longas e pelas brincadeiras de sempre, que me ajudaram a manter a calma e esquecer os problemas do dia a dia. Agraço aos meus tios, por me cederem a moradia que passei todos esses anos de graduação e me ajudaram em tudo que precisei, de alimentação aos conselhos nas altas h da madrugada, além disso agrazo as minhas primas, por todas as distrações e conversas intermináveis sobre tudo, que me ajudou bastante a conseguir manter a constância e a paciência. Agradeço aos meus amigos do ensino médio e de infância, que sempre me motivaram também e sabiam que era capaz de alcançar o que eu quisesse, além de todas nossas conversas e encontros. Obrigado amigos da graduação que me abraçaram e juntos conseguimos vencer mais uma etapa de muitas, obrigado às meninas, que sempre me ouviram e me ajudaram a não desistir e pela paciência em me ouvir falar dos mesmos assuntos várias vezes. Agradeço a Dra. Bella e a Dra. Cristiane, por terem me ensinado tudo sobre a pesquisa e prática de laboratório, toda essa experiência me tornou uma pessoa mais segura e capacitada, sou eternamente grato por tudo que fizeram e fazem por mim. Obrigado a Profa. Vânia e a Profa. Denise, pela oportunidade de fazer parte dessa equipe sensacional, e mais uma menção à Profa. Denise, por ter aceitado me orientar, obrigado pelos conselhos, pelas dicas e por todo apoio, saiba que cada palavra e conselho eu ouvi e pensei bastante, saiba que isso me motivou a prosseguir nos meus sonhos e pensar alto nas minhas conquistas, obrigado por ter pegado minha mão e me ajudado em todo esse processo, apoiando e ensinando. Obrigado a FUNCAMP, CNPq e a Universidade Federal do Ceará pelas oportunidades. Obrigado!

## RESUMO

O aumento populacional gerou uma série de preocupações ambientais e econômicas. No setor agrícola, a busca por novas alternativas de cultivo e produtos que pudessem acelerar o crescimento de culturas e eliminar novos fatores que afetam negativamente as lavouras, se tornou o desafio do século atual, com isso surgiu novas ideias, com novas aplicabilidades e metodologias ágeis, como o uso de insumos biológicos, biofertilizantes e estimulantes de plantas, provenientes de processo fermentativo de bactérias ácido-láticas (BAL). A necessidade de implementação de métodos de controle de qualidade que garantam a eficiência do processo, a qualidade e pureza dos microrganismos utilizados e padronização do produto final, são obrigatórios e necessários dentro da indústria. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo, avaliar, melhorar e implementar padrões e processos de controle de qualidade aplicáveis a um biofertilizante obtido por processo microbiológico a partir de resíduos de camarão, em acordo com as normativas e leis vigentes. A metodologia se baseou na implementação de análises microbiológicas (contagem de viáveis, coliformes totais, patógenos) e físico-químicas (Umidade, cinzas, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia de fluorescência, temperatura, pH) da matéria-prima, dos microrganismos empregados e do produto final. Como resultados, a implementação dos métodos de análises foram satisfatórios e garantiram a segurança do biofertilizante em conformidade com a legislação para atuar como Bioinsumo agrícola. Além disso, com as análises foi possível observar pontos de melhorias e padronização de processos que garantissem a segurança e rastreabilidade do produto final. Dessa forma, adoção desses métodos contribui para a oferta de bioinsumos com teores adequados de micro e macronutrientes, além de representar uma alternativa sustentável e eficiente frente aos insumos químicos que degradam o solo, impactam ecossistemas aquáticos e reduzem a qualidade da microbiota edáfica. Assim, o estudo evidencia a importância dos controles de qualidade na garantia de produtos seguros e alinhados às atuais demandas por uma agricultura mais sustentável, bem como para garantir eficiência operacional e melhoria contínua de processos.

**Palavras-chave:** Biofertilizantes; Controle de qualidade; Hidrolisado Proteico; Bactérias ácido láticas.

## ABSTRACT

Population growth has led to a series of environmental and economic concerns. In the agricultural sector, the search for new cultivation alternatives and products capable of accelerating crop growth and mitigating emerging factors that negatively affect agricultural production has become one of the main challenges of the current century. As a result, new ideas have emerged with innovative applications and agile methodologies, such as the use of biological inputs, biofertilizers, and plant biostimulants derived from the fermentative processes of lactic acid bacteria (LAB). The implementation of quality control methods that ensure process efficiency, as well as the quality and purity of the microorganisms used and the standardization of the final product, is mandatory and essential within the industry. Therefore, this study aimed to evaluate, improve, and implement quality control standards and processes applicable to a biofertilizer obtained through a microbiological process from shrimp waste, in accordance with current regulations and legislation. The methodology was based on the implementation of microbiological analyses (viable cell counts, total coliforms, and pathogens) and physicochemical analyses (moisture, ash content, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), fluorescence microscopy, temperature, and pH) of the raw material, the microorganisms employed, and the final product. The results demonstrated that the implementation of the analytical methods was satisfactory and ensured the safety of the biofertilizer in compliance with legislation for its use as an agricultural bioinput. In addition, the analyses made it possible to identify opportunities for process improvement and standardization, ensuring the safety and traceability of the final product. Thus, the adoption of these methods contributes to the supply of bioinputs with adequate levels of micro- and macronutrients, while also representing a sustainable and efficient alternative to chemical inputs that degrade soil, impact aquatic ecosystems, and reduce the quality of soil microbiota. Consequently, this study highlights the importance of quality control in ensuring safe products aligned with current demands for more sustainable agriculture, as well as in promoting operational efficiency and continuous process improvement.

**Keywords:** Biofertilizers; Quality control; Protein hydrolysate; Lactic acid bacteria.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>4</b>
<b>3.1</b>	<b>Agricultura sustentável e biofertilizantes.....</b>	<b>4</b>
<b>3.2</b>	<b>Fermentação Láctica.....</b>	<b>8</b>
<b>3.3</b>	<b>Normativas MAPA e Legislação .....</b>	<b>10</b>
<b>3.4</b>	<b>Controle de qualidade e métodos de análise.....</b>	<b>12</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>15</b>
<b>4.1</b>	<b>Preparo e análise dos microrganismos .....</b>	<b>15</b>
<b>4.2</b>	<b>Obtenção e análise da matéria-prima .....</b>	<b>18</b>
<b>4.3</b>	<b>Monitoramento e análise do processo de produção.....</b>	<b>19</b>
<b>4.4</b>	<b>Análises do produto final .....</b>	<b>21</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>5.1</b>	<b>Análise e qualidade dos microrganismos - inóculo .....</b>	<b>26</b>
<b>5.2</b>	<b>Padronização e qualidade da matéria-prima.....</b>	<b>28</b>
<b>5.3</b>	<b>Padronização e melhoria contínua do bioprocessamento .....</b>	<b>33</b>
<b>5.4</b>	<b>Análise e qualidade do produto final .....</b>	<b>34</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>7.</b>	<b>PESPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>45</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>46</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Com o avanço da Revolução Verde, a valorização de adubos e fertilizantes químicos ganharam um papel importante no cenário agroindustrial, visando a produtividade agrícola nas décadas de 1940 a 1970, contudo, esse avanço resultou na degradação ambiental, contaminação de solos e correntes hídricas, o que despertou uma preocupação em relação a sustentabilidade do novo sistema produtivo. A partir de 1980, diversos movimento agroecológicos se intensificaram, com o objetivo de propor soluções que mantivessem a alta produtividade e, ao mesmo tempo, menos impacto ambiental. A busca por alternativas de menos impacto se tornou o desafio do século XXI e alguns dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS II, XII, XII e XIV), no qual o uso consciente de insumos no sistema agrícola, trazia alternativas ao modelo convencional que pudessem impactar de forma positiva os meios agroindustriais e consequentemente o produtor rural (Costa; Barros; Freire, 2023).

Segundo Pérez; Lacruz; Arán, (2023), as práticas agrícolas modernas como uso exagerado de químicos que aceleram crescimento na lavoura, maquinas de pulverização e plantação são relevantes e necessitam de melhorias em qualidade para sucesso produtivo de colheitas, visando atender à crescente demanda populacional por alimentos, o que preocupa órgãos governamentais. Assim, é fundamental dar prioridade para a minimização dos impactos ambientais como contaminação de rios e correntes hídricas de importância social, perda de qualidade do solo e baixa produtividade, provocados pelo uso exagerado de agroquímicos destinados ao aumento das colheitas alimentícias. Dessa forma, os biofertilizantes orgânicos surgiram como alternativa promissora capaz de substituir métodos tradicionais de fertilização, que contribuem para emissão de gases de efeito estufa e para a contaminação de efluentes e seios de água, através da contaminação pelos solos e reação com outros compostos voláteis direcionados ao ambiente, afetando diretamente a saúde humana (Moreno-Hernández *et al.*, 2019).

Os biofertilizantes, adubos orgânicos resultados da fermentação entre resíduos orgânicos e água, compostos de microrganismos, resultando em um hidrolisado proteico (HP), ricos em nutrientes que atuam no melhoramento das plantas e, assim, agem na defesa contra patógenos do solo, podem ser inseridos no sistema de fertirrigação devido a sua alta solubilidade, contribuindo para a captação de nutrientes e ativação de mecanismos de

sinalização celular capazes de promover melhor absorção de nutrientes pelas plantas tratadas. Contudo, seu uso exagerado e sem segurança de qualidade, tornou-se um ponto preocupante para o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, que monitora e fiscaliza sua produção e estabelece limites mínimos e exigências para sua comercialização.

Dessa forma, torna-se imprescindível a implementação de métodos de controle de qualidade para assegurar a eficiência do processo, como a caracterização dos microrganismos utilizados, análise da matéria-prima, rastreabilidade do processo produtivo e a segurança do produto final, garantindo conformidade com normas e legislações vigentes do MAPA. (Costa; De Barros; Freire, 2023; Moreno-Hernández *et al.*, 2019; Nuzhyna *et al.*, 2024).

## 2 OBJETIVO GERAL

Avaliar, estabelecer e padronizar os métodos de análise utilizados no controle de qualidade de um biofertilizante obtido da fermentação de resíduos de camarão, assegurando sua conformidade com os parâmetros físico-químicos, microbiológicos, de eficiência e com as exigências estabelecidas pela legislação vigente.

### 2.1 Objetivos específicos

- Implementar métodos de qualidade nos microrganismos empregados na obtenção do Biofertilizante;
- Padronizar os parâmetros físico-químicos (pH, umidade, estabilidade, teor de nutrientes) da matéria-prima e do produto final;
- Avaliar a implementação dos métodos de qualidade microbiológica do produto final e identificar possíveis contaminantes;
- Comparar os resultados obtidos de implementação dos métodos com normas técnicas e padrões de qualidade estabelecidos pelo Ministério da Agricultura e Pecuária – MAPA;
- Propor e implementar recomendações para melhoria do processo e dos métodos de qualidade.

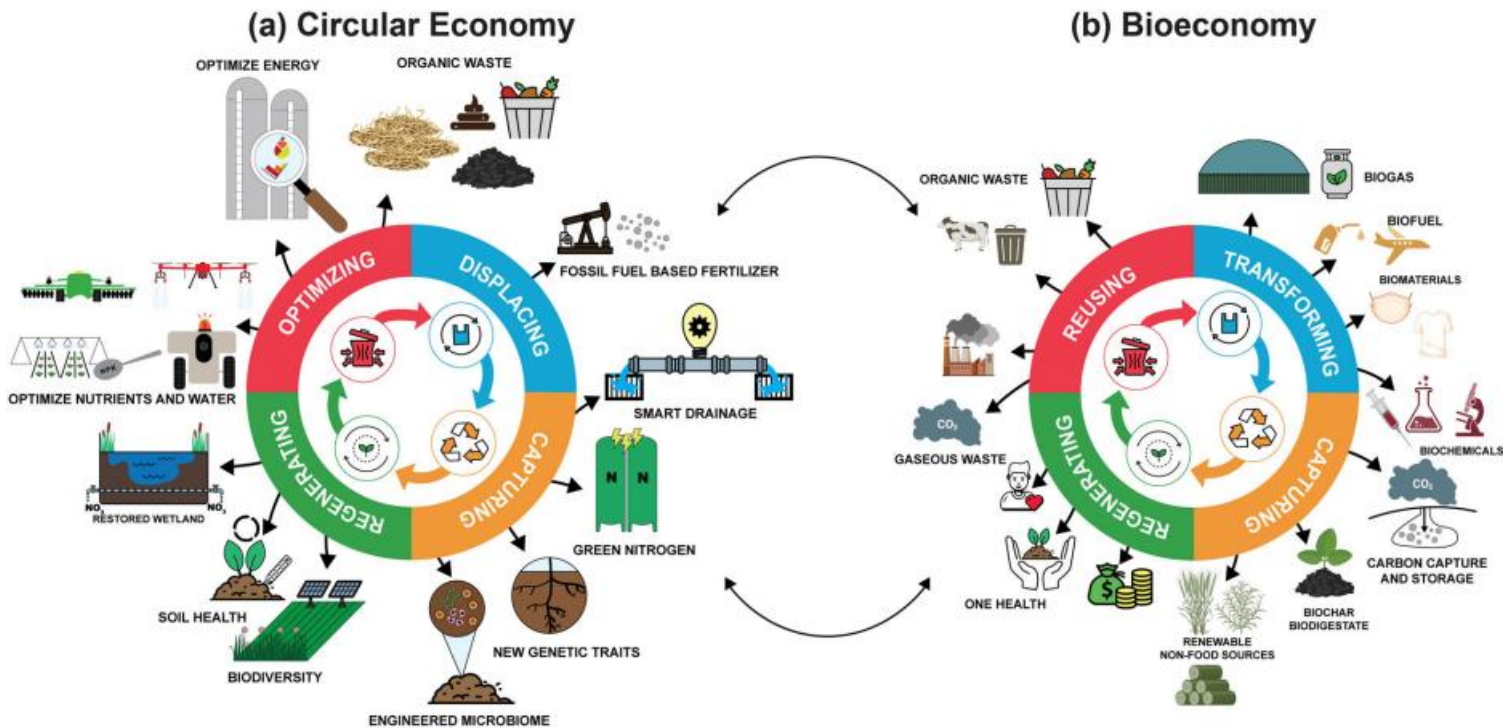
### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Agricultura sustentável e biofertilizantes

A agricultura sustentável se refere a adesão às boas práticas que podem contribuir para a preservação ambiental e o uso consciente dos recursos naturais pelos produtores, assegurando a qualidade e segurança dos alimentos, reduzindo custos operacionais e substituindo o uso de insumos químicos por práticas sustentáveis e o uso de insumos biológicos (Brasil, 2025).

A agricultura é o setor mais importante e influente nos aspectos alimentícios, econômicos e de desenvolvimento social e dos países (Moreno-Hernández *et al.*, 2019). De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), a população mundial alcançará a marca de mais de 9 bilhões de indivíduos até 2050, com isso, a demanda alimentícia crescerá exponencialmente e conseqüentemente a cobrança por mais recursos ambientais e práticas sustentáveis tem se tornado cada vez mais intensa. A economia circular é um mecanismo essencial para a agricultura mais sustentável, que visa sair de um sistema linear, onde gera grande quantidade de resíduos e conseqüentemente contaminação ambiental, para um sistema onde é possível reaproveitar resíduos para uma destinação mais ecológica e que possa gerar valor agregado a esses subprodutos gerados. A integração de ciências econômicas, ambientais, agrícolas e de engenharia é essencial para desenvolver análises precisas sobre custos, benefícios e trajetórias da transição. Assim, a bioeconomia pode impulsionar a economia circular fornecendo recursos renováveis e sustentáveis que podem ser reutilizados. O conceito de bioeconomia consiste na geração de valor e economia do uso e fornecimento de resíduos biológicos abrangendo a biotecnologia e recursos biológicos de diversas fontes para reduzir o uso de resíduos fósseis que sejam tóxicos ambientalmente (Khanna 2024). A figura 1 mostra a ligação entre a economia circular e a bioeconomia, entendendo como uma complementa e é importante para a geração de valor à resíduos industriais.

**Figura 1:** Os dois painéis mostram as interconexões entre os caminhos para reduzir, reciclar e reutilizar resíduos e para converter resíduos inevitáveis e outros recursos biológicos em bioprodutos que substituem os combustíveis fósseis. Painel A representa múltiplos caminhos para reduzir e reutilizar resíduos em uma economia circular; o painel B representa múltiplos caminhos para produzir insumos, alimentos e produtos energéticos em uma bioeconomia.



**Fonte:** An economic perspective of the circular bioeconomy in the food and agricultural sector (Khanna 2024).

Dentre as práticas sustentáveis desenvolvidas está o uso de bioinsumos, como os biofertilizantes. Segundo Costa; de Barros; Freire (2023), biofertilizantes podem ser definidos como adubos orgânicos resultados da fermentação de resíduos orgânicos por microrganismos, resultando em um hidrolisado proteico (HP), ricos em nutrientes que atuam na nutrição das plantas e, assim, agem na defesa contra patógenos do solo. Ainda, segundo McCarth; O'Callaghan; O'Brien (2013) a busca por hidrolisados proteicos se tornou uma tendência nos últimos anos, dentre estes, estão provenientes de plantas, crustáceos e outros. O uso de biofertilizantes como alternativa para o desenvolvimento na agricultura se tornou uma ferramenta essencial pela sua atuação biológica e econômica, além da capacidade de promover diferentes mecanismos fisiológicos de desenvolvimento e proteção das plantas (Moreno-Hernández *et al.*, 2019).

A aplicação de biofertilizantes orgânicos pode gerar uma nova forma de cultivo mais saudável, minimizando o uso de adubos químicos, além de promover renda extra a

pequenos agricultores (Manoel *et al.*, 2020). Além disso, esses fermentados com a participação de bactérias e leveduras possuem efeito fito hormonal, antifúngico e nematicida, que atuam como um protetor natural contra outras pragas, com danos reduzidos ao ambiente e à saúde humana (Silva *et al.*, 2007).

A produção de biofertilizantes pode ser realizada de diversas formas e com diferentes componentes, dentre eles, restos de comidas, resíduos provenientes do beneficiamento alimentício, como da carcinicultura entre outros, no qual, quanto mais componentes presentes, mais a chance de se obter um fertilizante mais completo e rico em nutrientes essenciais às plantas, enzimas e microrganismos do solo (Costa; de Barros; Freire, 2023). Essa prática está relacionada com a economia circular, gerando valor agregado a esses resíduos que geralmente não possui uma destinação correta (Khanna 2024).

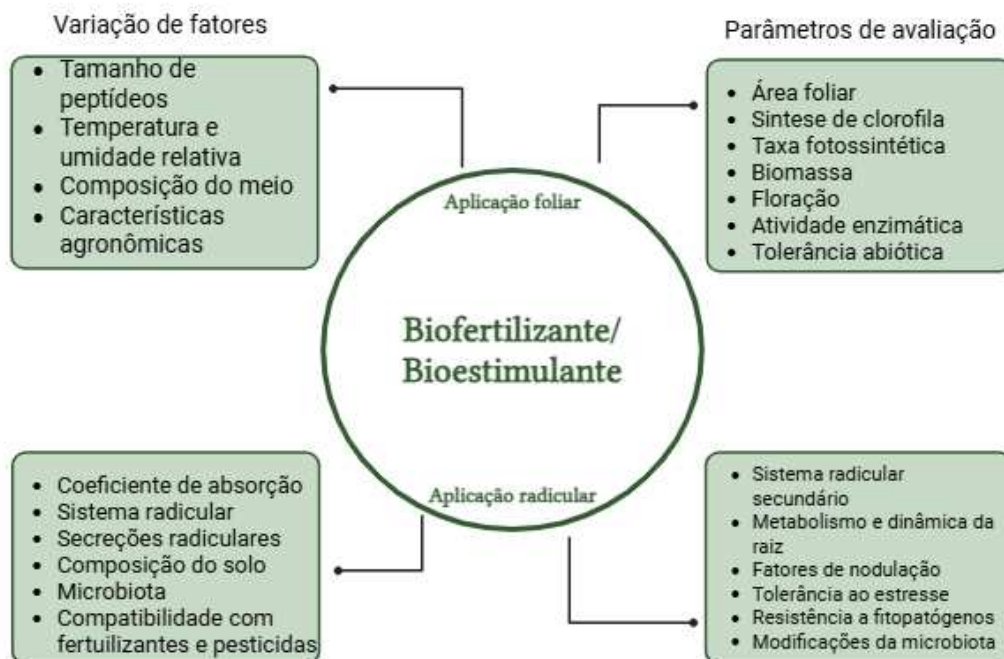
A carcinicultura é o segmento da aquicultura que mais cresce no mundo. No Brasil, são produzidas cerca de 200 mil toneladas de camarão em cativeiro por ano. Desse total, 50% se transformam em resíduos (cabeça e casca) durante o processo de filetagem, na indústria de beneficiamento. Esses resíduos são constituídos por compostos de alto valor agregado, incluindo proteínas, pigmentos, minerais e quitina, que são literalmente descartados como lixo, poluindo o meio ambiente. O uso do hidrolisado desses resíduos como biofertilizante se dá pela sua capacidade de promover melhores resultados na agricultura e substituir agroquímicos usados comumente. Sua obtenção se dá através da fermentação de resíduos de camarão com um consórcio de bactérias lácticas selecionadas, pela alta produção de ácido lático e proteases. Ao final do processo é possível separar o hidrolisado proteico (biofertilizante), da quitina (bioestimulante), que atua no estímulo de defesa contra patógenos. O hidrolisado contém aminoácidos, pigmentos carotenoides, ácidos graxos, enzimas, minerais, oligossacarídeos da quitina, e uma microbiota majoritariamente composta por bactérias benéficas, além de leveduras. A bioconversão desses resíduos em produtos de valor agregado é ambientalmente amigável, segura e com excelente custo-benefício.

Dentre os processos de produção do biofertilizante existe o processo químico, hidrólise enzimática e fermentação láctica (Ghorbel-Bellaaj *et al* 2012). O processo químico exige o uso de ácidos e bases fortes, o que não é ecologicamente bom e resulta na contaminação de ambientes por resíduos tóxicos, já a hidrólise enzimática é eficiente e consegue extrair eficientemente a quitina e o líquido de interesse para a formulação do biofertilizante, porém é o um processo de alto custo. Já o processo de fermentação é uma alternativa economicamente viável e prática, além de ser ecológica e não gerar produtos secundários tóxicos ao ambiente, é

um processo que realiza a desproteíntização e a desmineralização, se tornando eficiente no uso em resíduos da carnicultura (Cira; Huerta; Shirai 2002; Ghorbel-Bellaaj *et al.*, 2012).

Os biofertilizantes podem ser aplicados na folha – adubação foliar – sobre o solo - fertirrigação - ou sobre as sementes (Silva *et al.*, 2007). Vale ressaltar que o uso de biofertilizante proteicos via fertirrigação é recomendado principalmente por ter uma maior taxa de solubilidade e absorção, prevenindo agregados insolúveis e interações indesejadas com outros nutrientes (Moreno-Hernández *et al.*, 2019). Os hidrolisados proteicos advindos de pescados melhoram a utilização dos nutrientes pelas plantas, além de aumentar a tolerância à seca e possuir característica bioestimulantes à atividade da microbiota benéfica das plantas, como observado na figura 2, onde mostra a variabilidade das respostas com diferentes formas de aplicação (Nuzhyna *et al.*, 2024).

**Figura 2** – Variabilidade de respostas do uso de biofertilizantes por vias de aplicação foliar e radicular.



**Fonte:** Imagem criada pelo autor baseado em Moreno-Hernández *et al* (2019). Criado em: <https://biorender.com>.

As propriedades biológicas de peptídeos e hormônios possibilitados pelo uso de hidrolisados proteicos induzem respostas similares às respostas metabólicas e fisiológicas da planta (Moreno-Hernández *et al.*, 2019). Alguns componentes advindos de frutos do mar

possuem uma quantidade considerada de aminoácidos, por exemplo a prolina, essencial como precursor de fitohormônio para a planta, se tornando uma característica para a composição de bioestimulantes a base de proteínas, assim, além da função biofertilizante, esses hidrolisados possuem características bioestimulantes, uma vez que, evidências mostraram maiores atividades hormonais e processos bioquímicos a partir do uso desses hidrolisados como bioestimulantes, observando estímulos bióticos e abióticos (Moreno-Hernández *et al.*, 2019).

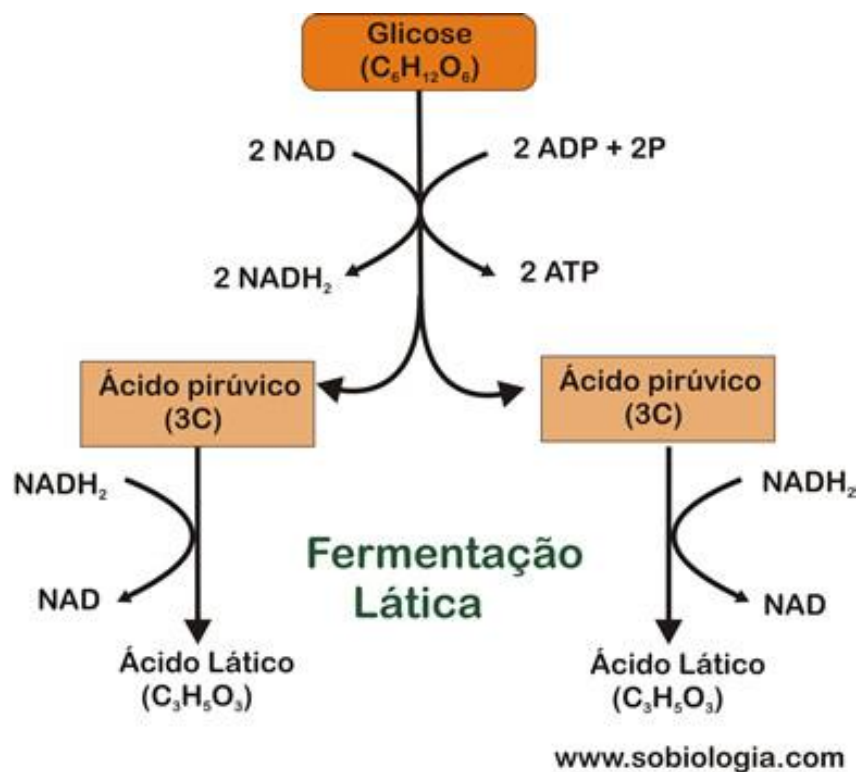
Ainda de acordo com o autor, com o avanço dos estudos em análise do desenvolvimento de bioestimulantes de base proteica animal e/ou vegetal, é possível observar resultados significativos no aproveitamento de aminoácidos presentes nesses hidrolisados, capazes de estimular respostas consideráveis no desenvolvimento vegetal. Segundo García-Santiago *et al* (2021), hidrolisados proteicos advindos de bioprocessos utilizando resíduos de peixe e orgânicos, aplicados por meio de um sistema de subirrigação, conseguem prover mais nutrientes para as plantas e foi possível observar a presença de mais fitoquímicos e polifenóis em comparação à vegetais submetidos a adubação convencional. Os biofertilizantes/bioestimulantes são uma alternativa interessante para o uso em plantas, por serem um produto rico em bioativos que vão interferir no metabolismo primário ou secundário do organismo, contribuindo para desenvolver a capacidade de se adaptarem às condições mais extremas e de defesa, além de estimular o crescimento e produtividade da espécie (Nuzhyna *et al.*, 2024).

### **3.2 Fermentação Láctica**

A fermentação láctica pode ser definida como processo biológico envolvendo o uso de bactérias ácido lácticas (BAL), principalmente *Lactobacillus*. Na figura 3, pode-se observar as vias metabólicas envolvidas na fermentação láctica e na produção do ácido láctico por bactérias. Essas bactérias são gram-positivas, não esporuladas. Estão presentes em diversos ambientes como alimentos, bebidas e microbiota intestinal. Adaptadas a viver em ambientes ácidos e temperaturas variadas, tendo como principal produto final do metabolismo de carboidratos, o ácido láctico quando homofermentativas (Admassie 2018; Lin *et al* 2005; Cira; Huerta; Shirai 2002; Ximenes 2015). Na fermentação láctica em resíduos da carcinicultura, o ácido láctico produzido a partir da hidrólise de carboidratos adicionados como substrato acidifica o meio e conseqüentemente inibe a proliferação de outros microrganismos deteriorantes do processo, além disso o ácido, juntamente com enzimas proteolíticas liberadas pelas bactérias ajudam na hidrólise das proteínas aderidas á quitina, liberando as moléculas e os minerais (carbonato de cálcio) da quitina. O final da fermentação gera dois produtos valiosos ao mercado,

a quitina e o líquido, rico em aminoácidos e proteínas que vão ser usados para a produção de biofertilizantes, rações e como componentes de outros produtos. A eficiência da fermentação conta com diferentes fatores analisados, como qualidade da matéria-prima (cabeças e cascas de camarão), qualidade do uso do inóculo, proporção de inóculo, higienização do processo, temperatura e pH, além do tempo de fermentação (Rao; Muñoz; Stevens, 2000 citado por Ximenes 2015). Ao final do processo fermentativo em resíduos de carcinicultura, obtém-se o hidrolisado proteico (HP), rico em componentes essenciais às plantas e capaz de se tornar um biofertilizante promissor e estratégico ao uso de insumos químicos tradicionais e a quitina (parte sólida), sendo fonte para diversos usos desde a saúde ao meio ambiente, sendo fonte para produção de quitosana e uso agroindustrial.

**Figura 3:** Vias metabólicas envolvidas na fermentação láctica e produção do ácido láctico por BAL's.



**Fonte:** SO Biologia, disponível em: <https://www.sobiologia.com.br/conteudos/bioquimica/bioquimica4.php>.

As bactérias ácido lácticas são conhecidas por serem adaptáveis a diferentes condições na qual são submetidas, mantendo seu desempenho constante e sua eficiência produtiva (Wang *et al* 2021). Elas, conseguem se adequar a diferentes variações de temperatura e baixo pH, principalmente por sua produção de ácido láctico, tornando o meio ácido, logo,

conseguem se manter bem nesses ambientes desenvolvidos por suas próprias atividades metabólicas, além disso, conseguem manter seu nível de eficiência estável em desequilíbrio de disponibilidade de nutrientes. Essas condições são características metabólicas fortemente presente nesses gêneros, capazes de produzir substâncias protetoras e tolerantes como ácido láctico, exopolissacarídeos e outros. (Wang *et al* 2021; Lin *et al* 2006).

### 3.3 Normativas MAPA e Legislação

No Brasil, existem legislações importantes para a produção e composição de fertilizantes orgânicos. O Decreto N° 4.954, de 14 de janeiro de 2004, estabelece biofertilizantes como produtos de natureza orgânica, obtido por processo físico, químico, biológico ou bioquímico em ambiente controlado ou não, a partir de matéria-prima de origem industrial, rural, vegetal ou animal e que pode ser enriquecida ou não com nutrientes minerais. Além disso, podemos citar os biofertilizantes de aminoácidos, como produtos obtidos a partir da fermentação ou hidrólise de material orgânico (Decreto N° 4.954, 2004).

No Art. 14 da Instrução Normativa - IN 61 e no Art. 15 do Decreto N° 4.954 de 2004, fica estabelecido que o registro dos biofertilizantes devem ser realizados junto ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. Para os biofertilizantes, o registro será aprovado com base nas garantias mínimas exigidas para cada um dos grupos que o produto se configura, sendo necessário a elaboração de um relatório de bioensaio que deve ser formulado por uma Instituição de Pesquisa Oficial Brasileira que comprove a bioatividade do produto. A IN MAPA N° 6 de 2016 que corrige a IN MAPA N° 53 de 2013, estabelece que os testes para elaboração do relatório técnico devem ser realizados com pelo menos duas culturas diferentes para aquelas que será recomendado o uso do produto, em casa de vegetação.

Além disso, segundo o Decreto N° 4.954, de 14 de janeiro de 2004, compete ao MAPA, inspecionar e fiscalizar a produção ou exportação desses produtos para garantir segurança e registro no órgão. Já no Art. 57 do mesmo decreto, estabelece que, independentemente do controle de fiscalização, as empresas produtoras devem de forma obrigatória dispor de procedimentos que garantam a qualidade e segurança do produto, além dos processos de fabricação. Essas análises devem ser realizadas em laboratório próprio credenciado ou por terceiros que estejam cadastrados e autorizados pelo MAPA a realizar esses procedimentos e liberar laudos de garantia.

Segundo o Decreto N° 10.375 de 26 de maio de 2020 que institui o Programa Nacional de Bioinsumos, bioinsumos podem ser configurados como um produto oriundo de um

processo ou tecnologia vegetal ou animal de origem biotecnológica similar ao processo natural, que destina-se à produção, proteção e beneficiamento de sistemas agropecuários ou no sistemas florestais que possam interferir positivamente no crescimento, desenvolvimento e nos mecanismos de defesa, além de promover interações entre solo e microrganismos. Além disso, o programa define biofertilizantes como produtos que contenham ativos e substâncias orgânicas, obtidos de microrganismos ou de sua atividade que sejam capazes de atuar diretamente no beneficiamento de plantas cultivadas e no aumento de sua produtividade. A Instrução Normativa (IN) MAPA n° 61/2020, estabelece a definição, registro, caracterização, segurança, rotulagem e comercialização de fertilizantes orgânicos e biofertilizantes no Brasil. Segundo a normativa citada, os biofertilizantes podem ser caracterizados como substâncias que possuam um princípio ativo orgânico, isentos de compostos agrotóxicos, capazes de promover e melhorar de forma produtiva o desenvolvimento de plantas tratadas.

A bioatividade de um biofertilizante é denominado como sua eficiência e benefício que promovem às plantas cultivadas (IN MAPA N° 61/2020). Vale ressaltar que, os biofertilizantes podem ser divididos em duas categorias, onde os biofertilizantes advindos do beneficiamento da carcinicultura se enquadram na categoria A, que define biofertilizantes de matéria-prima orgânica proveniente de serviço agropecuário, industrial e comercial que tenham seu processo regulado por órgão ambientais e evitem a contaminação com resíduos sanitários e os tornem seguros para uso na agricultura. Outrossim, a normativa garante a não adição de outras substâncias que não sejam essenciais ao processo de produção dos biofertilizantes. Ainda, segundo o Art. 12 da IN MAPA n° 61/2020, os biofertilizantes, de acordo com o grupo a que pertençam, deve possuir algumas garantias como o teor mínimo de aminoácidos livres, para os biofertilizantes de aminoácidos, sendo 1% para fluidos e 5% para sólidos.

Além disso, a Lei N° 15. 070 de 23 de dezembro de 2024 – Marco Regulatório dos bioinsumos, dispõe a regulação sobre a produção, importação, exportação, além do registro, uso, inspeção e fiscalização dos resíduos destinados à produção de insumos agrícolas. Criada para categorizar e dar exclusividade ao grupo de bioinsumos, como produtos divergentes dos agroquímicos. Além disso, a lei disciplina sobre o ciclo de produção, embalagem, registro e comercialização dos bioinsumos, promovendo motivação a esse tipo de produção e assim, contribuir para a redução de compostos químicos que agredam o meio ambiente e as lavouras tratadas. Essa lei garante segurança jurídica sobre biofertilizantes, garantindo o controle de qualidade e a rastreabilidade dos bioinsumos comercializados. Essa lei, junto com as IN e decretos, garantem a maior facilidade de produção e comercialização dos bioinsumos, além do

estímulo desses produtos na agricultura; promovendo a redução de agrotóxicos que impactam negativamente produtores e consumidores (Lei N° 15. 070, 2024).

### **3.4 Controle de qualidade e métodos de análise**

As normas ISO criadas pela *International Organization for Standardization*, tem por objetivo criar regras e padrões internacionais para todas as áreas do comércio, a fim de facilitar os processos de comercialização e criação, além de garantir a segurança, qualidade e satisfação dos clientes. Todas as normas ISO's visam ter requisitos generalistas para serem aplicados por todas as organizações, independente de seu processo, produto ou serviço (ISO 9001:2015). A implementação de um sistema de gestão de qualidade é uma ferramenta estratégica para a organização que quer se destacar no mercado regional e global (ISO 9001:2015). Segundo a ISO 9001, abordar riscos e oportunidades, promover consistência dos produtos e serviços e demonstrar conformidades com requisitos especificados são benefícios potenciais para a organização que implementa esse tipo de gestão de qualidade.

Segundo a ISO 22000, indústrias do segmento alimentar em todas as categorias globais devem garantir a qualidade de seus produtos para segurança dos clientes, com isso, ela estabelece diversos padrões de segurança e qualidade a serem seguidos pelas organizações que implementam o sistema de gestão, como padronização do processo, segurança da matéria-prima e informação documentada de todas as etapas, com o objetivo final da satisfação do cliente.

O controle de qualidade é a etapa principal no processo produtivo de biofertilizantes, uma vez que garante atender aos requisitos de eficiência agronômica, segurança ambiental e conformidade com a legislação. Segundo a IN N° 61/2020 – MAPA, são necessários a quantificação de parâmetros físico-químicas (pH, matéria seca, relação C/N, nitrogênio total, macronutrientes e micronutrientes) e microbiológicos (Coliformes totais, *Salmonella spp*, fungos e bactérias, viabilidade de bactérias inoculadas) para garantir a eficiência e qualidade de um biofertilizante, estabelecendo limites para produção, comercialização e utilização, prevenindo impactos à saúde humana de consumidores e produtores, além dos bioensaios de eficiências em casa de vegetação ou campo para validar germinação e viabilidade agronômica. A qualidade deve ser garantida em todas as etapas de produção até a análise final do produto.

A garantia de qualidade inicia-se na escolha do fornecedor e obtenção da matéria-prima. De acordo com o Programa Nacional de Bioinsumos no Brasil (2020), a matéria-prima pode ser definida como material ou organismos utilizado para garantir a formulação,

composição e função de um produto ou para se obter o ingrediente ativo. Segundo a IN MAPA N° 61/2020, a matéria-prima para uso no processo de produção de fertilizantes orgânicos deve estar isenta de contaminantes químicos que afetem as características sensoriais e físicas da matéria. A ISO 22005:2007, normativa do grupo ISO 22000, que garante a rastreabilidade de suprimentos da cadeia produtiva, o que envolve indiretamente a produção de biofertilizantes, uma vez que estes atuam diretamente na produção alimentícia global, é importante garantir a qualidade do produto desde a captação da matéria-prima segura. Após implantada, essa normativa garante o controle de segurança, melhorias das análises do processo, documentação e registro de otimização da produção.

Além disso, a IN MAPA N° 6 de 2016 estabelece a necessidade de validação de eficiência em casa de vegetação para garantir a que o produto comercializado seja eficaz na melhoria das plantas, assim sendo necessário a elaboração de relatório técnico de uma instituição de pesquisa autorizada pelo MAPA.

Os métodos de coleta de amostras para análises microbiológicas e físico-químicas seguem padrões de normas internacionais da *American Public Health Association (APHA)* e da *International Organization for Standardization (ISO)*. Segundo a ISO 6579, para alimentos, é necessário coletar uma amostra de 25 mL ou 25 g do produto para realizar análises microbiológicas e testes bioquímicos quando necessário. Esse método pode ser utilizado para produtos alimentícios e adaptados para outros produtos agropecuários quando necessário, desde que obedeça às normas de coleta exigidos pela legislação (ISO 6579:2002). Ainda, segundo a norma, é necessário seguir um padrão para coletar essas amostras como material estéril, homogeneidade do lote analisado e avaliar padrões físico-químicos como medição de pH, temperatura padrão, odores, texturas e fornecedor seguro. Para resíduos, avaliar segurança do transporte, isolamento de contaminantes químicos e outros resíduos que possam alterar a originalidade da matéria-prima.

De acordo com as normas do grupo ISO 6887, adaptadas do Livro Manual de Análises Microbiológicas de Alimentos e Água de Silva *et al* (2017), que visam garantir a qualidade de todo o processo de análise e um resultado final seguro, recomenda-se a observação de pontos importantes antes das análises como ambiente asséptico, ambientes fechados para ventilação não interferir nos resultados, garantir que todo material necessário estejam sob bancada e estéril, manuseio e procedimentos feitos em cabines de fluxo laminar vertical para evitar contaminação do ambiente e procedimentos imprudentes que possam comprometer a garantia de qualidade das amostras e consequentemente comprometer o produto. Ainda de

acordo com as normativas citadas os ensaios gerais envolvem a quantificação de contagem total de aeróbios mesófilos ou psicotróficos, bolores e leveduras, bactérias lácticas, enterobactérias, coliformes totais, termotolerantes e *E. coli*, *Salmonella* e *Pseudomonas*.

Segundo a ISO 7218:2024, deve-se armazenar nas mesmas condições antes da análise, uma alíquota, para garantir a repetição dos testes, quando necessário, sendo estabelecida pelo laboratório o prazo de duração para descarte e, quando preciso, ser descartado de acordo com as normas que estabelecem, como descarte no lixo ou descontaminação quando este tiver presença de microrganismos. De acordo com a ISO 6887-1 (1999) e ISO 7218:2024, a análise microbiológica tem o principal objetivo de detectar e enumerar microrganismos vivos. Devido à grande presença de grupos, gêneros e espécies diferentes, é necessária uma série de ensaios que podem ser de dois tipos: qualitativos, que visam confirmar a presença ou ausência de microrganismos alvos em uma dada amostra, e ensaios quantitativos que determinam a quantidade dos microrganismos alvos na amostra, registrados por unidade de massa ou volume. Vale ressaltar, que esses testes podem variar dependendo dos microrganismos avaliados, porém grande parte segue os mesmos procedimentos padrões, podendo ser adaptados para os diferentes tipos de amostras analisados.

De acordo com a IN N° 30 de novembro de 2010, todos os materiais utilizados para a análise devem estar devidamente esterilizados e os produtos devem ser manipulados em fluxo laminar, a fim de evitar qualquer contaminação. Ainda segundo a instrução, as diluições seriadas são as etapas iniciais e principais para determinar a concentração correta para análises e contagens de microrganismos.

A duplicata ou triplicata para cada amostra, garante a confiabilidade dos métodos utilizados e dos resultados; para contagem de bactérias e fungos, devem estar dentro do padrão de contagem entre 30 e 300 UFC/mL, sendo que caso os resultados sejam divergentes do padrão, considerar a média das duas últimas repetições mais próximas que não sejam discrepantes e cumpram os limites estabelecidos pelas normativas. Portanto, fica justificado a importância da qualidade de fertilizantes orgânicos para a produção rural, garantindo eficiência agrônômica, e segurança cumprindo o papel de substituir agrotóxicos, a fim de reduzir impactos danosos ao meio ambiente e à saúde humana.

## 4 METODOLOGIA

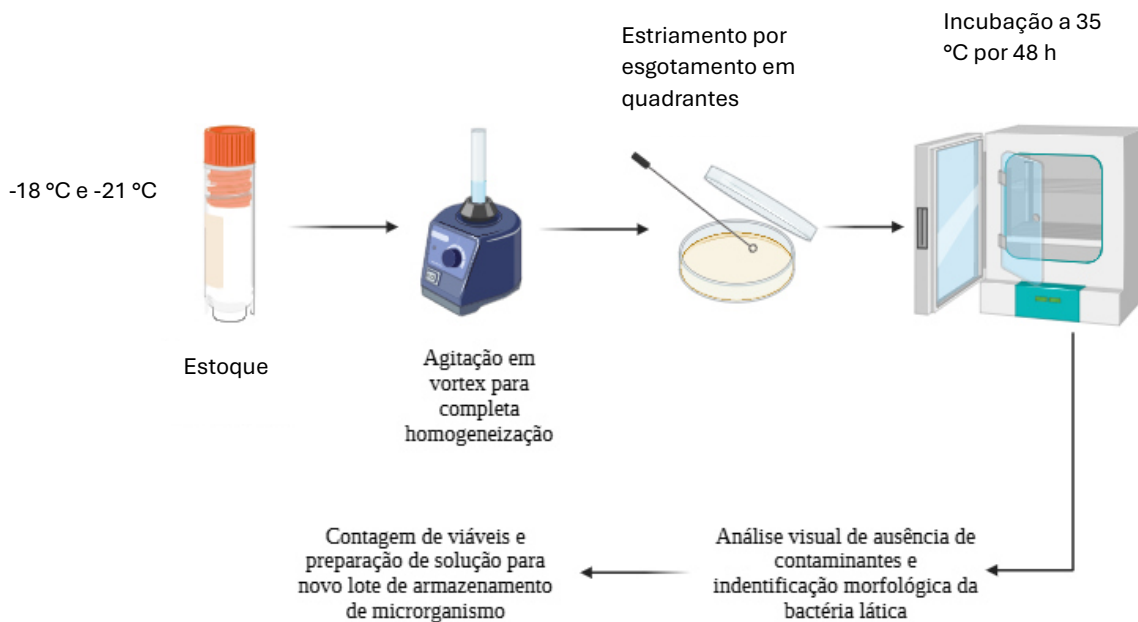
As análises de controle de qualidade dos microrganismos empregados, matéria e prima e produção do biofertilizante foram baseadas no Manual de Análises Microbiológica de Alimentos e Água de Silva *et al* (2017), que são elaboradas de acordo com métodos padronizados e publicados por organizações internacionais renomadas, como a *American Public Health Association (APHA)*, a *International Organization for Standardization (ISO)*, a *Food and Drug Administration (FDA)*, o *United States Department of Agriculture (USDA)* e a *AOAC International*, a fim de garantir a padronização dos processos e segurança dos resultados. Além disso, algumas análises correspondem, também, aos requerimentos de qualidade do MAPA, para produtos agrônômicos brasileiros, com faixa de tolerância para composição e aplicação. O processo de implementação de padronização dos métodos de controle de qualidade foram ocorrendo durante os processos de produção na Biotech4life, junto com procedimentos já existentes e com a melhoria contínua. Os procedimentos foram divididos em 4 partes principais: análise dos microrganismos (inóculo), da matéria-prima, do processo produtivo e do produto final.

### 4.1 Preparo e análise dos microrganismos

Os microrganismos utilizados são bactérias lácticas, advindos do banco de microrganismos do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (Lembiotech) e armazenados na Biotech4life Soluções. Padronizado de acordo com a norma ISO 6887 e suas derivações adaptadas do Manual de Análises Microbiológicas de Alimentos e Água de Silva *et al* (2017), o processo de garantia de qualidade estabelecido definiu um prazo de até três meses de armazenamento para os microrganismos em freezer a - 18 °C - 21 °C, armazenadas em meio Man, Rogosa e Sharpe (MRS) com 20% de glicerol, garantindo sua eficiência pelo tempo determinado e, para a contagem de viáveis foi determinado o método *Spread plate*.

Para realização do processo de armazenagem, foi realizado o controle de qualidade das bactérias por espalhamento em quadrantes para teste de pureza e risco de contaminação. Assim, inicialmente foi selecionado um dos tubos criogênicos do lote anterior armazenado, descongelado e submetido ao procedimento. Esse método é o meio mais prático e rápido de analisar bactérias isoladas da ausência de outros contaminantes como fungos e outras bactérias de morfologia diferentes. Vale destacar que informações a respeito de composição de meio, materiais específicos utilizados na fermentação, volumes de alíquotas, métodos de produção e características de equipamentos não foram mencionadas devido segredo industrial, uma vez que o trabalho foi realizado em uma empresa privada.

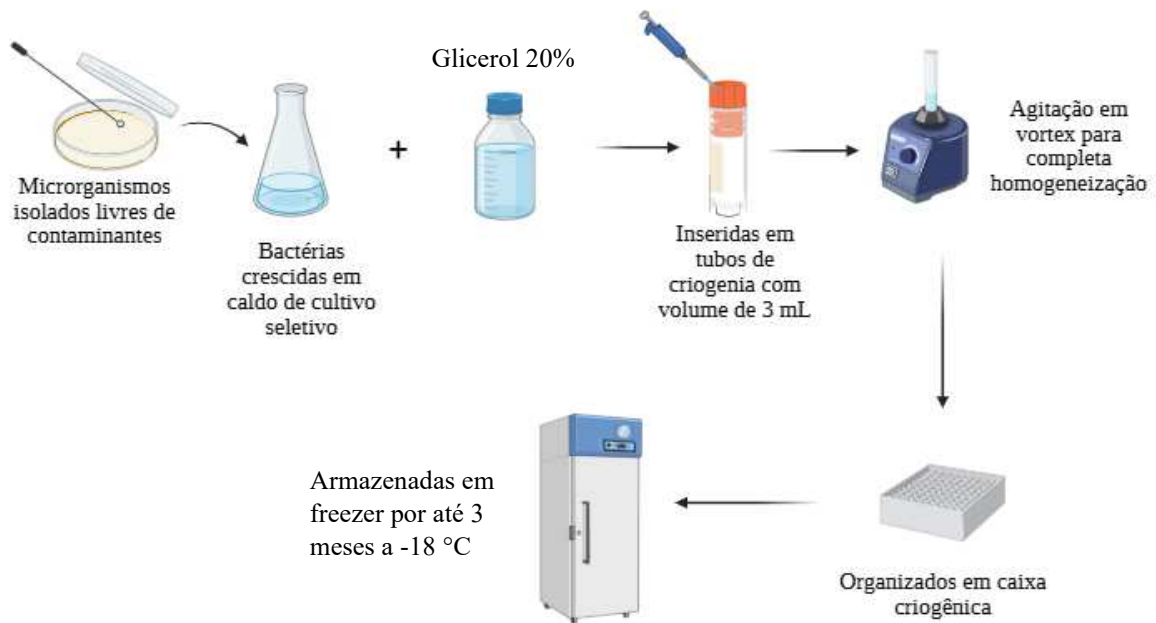
**Figura 4:** Representação de controle de qualidade das bactérias lácticas por espalhamento em quadrante em placa de Petri.



**Fonte:** Imagem criada pelo autor em: <https://www.biorender.com>.

Os microrganismos armazenados anteriormente foram selecionados e retirados do freezer, descongelados em temperatura ambiente junto com agitação para completa homogeneização do meio. Em seguida foi retirado uma alíquota, com ajuda de uma alça de inoculação de volume de 10 µl, das bactérias e inoculadas em placa de Petri contendo meio Man, Rogosa e Sharpe (MRS) de crescimento seletivo para bactérias lácticas, espalhadas em quatro quadrantes de forma a obter melhor visualização das colônias de interesse. Em seguida as placas devidamente embaladas são armazenadas em estufa incubadora por 48 h a 35 °C, após isso, foram analisadas visualmente para verificação de contaminantes e definição de características morfológicas padrão (cor, formato e tamanho). Após estabelecido que a cultura estava pura e com qualidade para crescimento, elas foram para a etapa de novo estoque. Vale ressaltar que esse processo pode ser repetido por até cinco subcultivos consecutivos da cepa de bactérias lácticas. A partir desse limite, recomenda-se retornar ao estoque inicial (cepas-mãe armazenadas em condições adequadas) para evitar deriva genética, perda de características fenotípicas desejáveis e garantir a padronização e a reprodutibilidade dos resultados.

**Figura 5:** Representação do processo de preparação de estoque de bactérias lácticas para fermentação industrial.



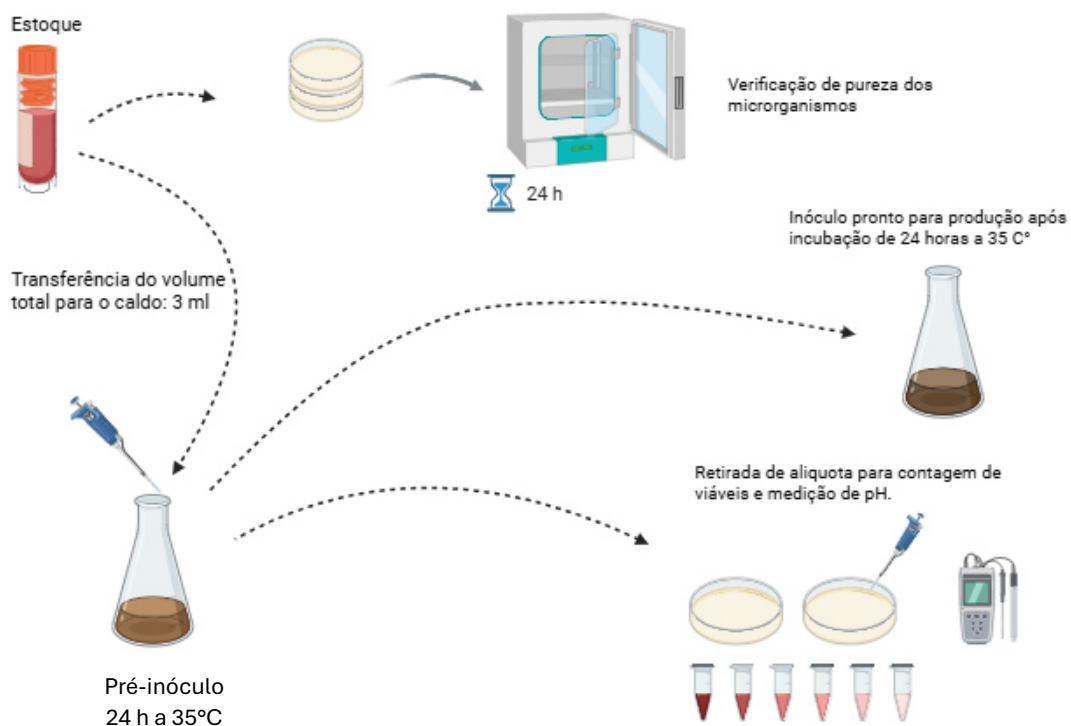
**Fonte:** Imagem criada pelo autor em: <https://www.biorender.com>.

Uma colônia foi transferida, da placa contendo as bactérias isoladas pela metodologia de isolamento em quadrantes, para um caldo MRS de cultivo seletivo para o microrganismo de interesse. Após crescidas por 48h em estufa, foi retirado uma alíquota de 60% do caldo contendo os microrganismos e adicionados ao tubo criogênico contendo glicerol 20% de acordo com interesse estabelecido. Em seguida, o tubo contendo o material foi agitado para completa homogeneização, identificadas, acondicionadas em caixa de criogenia e armazenadas no freezer por até 3 meses com temperatura média de - 18 °C a - 21 °C para uso na produção de inóculo para fermentação industrial.

Já para realização do inóculo foram realizadas contagens de viáveis dos microrganismos antes de realizar a fermentação. Foi selecionado um tubo criogênico contendo as bactérias em glicerol, agitada em vórtex e em seguida, com ajuda de uma alça de inoculação, foi retirado uma alíquota para espalhamento em quadrantes em triplicata em placa contendo meio MRS para bactérias lácticas e incubadas em estufa por 48 h a 35 °C. Após crescidas e livres de contaminantes, garantindo a qualidade das bactérias, foi adicionado o volume total do estoque selecionado ao Erlenmeyer contendo o meio específico produzido pela Biotech4Life, em seguida levadas para crescimento e incubadas novamente em estufa por 24 h a 35 °C. Passando 24 h, foi tirado uma alíquota de 3 mL do frasco para medição de pH e contagem de viáveis; a determinação de pH ácido entre 3 e 4 é positivo para um ótimo crescimento e assim,

prontas para o processo industrial. A alíquota foi diluída até  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$ , e pipetadas e espalhadas pelo método *spread plate* em placas contendo MRS em duplicata e armazenadas em estufa por 24 h a 35 °C; após o tempo de incubação, as colônias foram contadas para estimar o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mililitros além de avaliar o grau de pureza, ausência de contaminantes. Os resultados da contagem foram registrados em planilha de controle, compartilhada para acesso de toda a equipe.

**Figura 6:** Representação do processo de crescimento de bactérias lácticas e preparo de pré-inóculo de volume menor e inóculo de volume maior para produção.



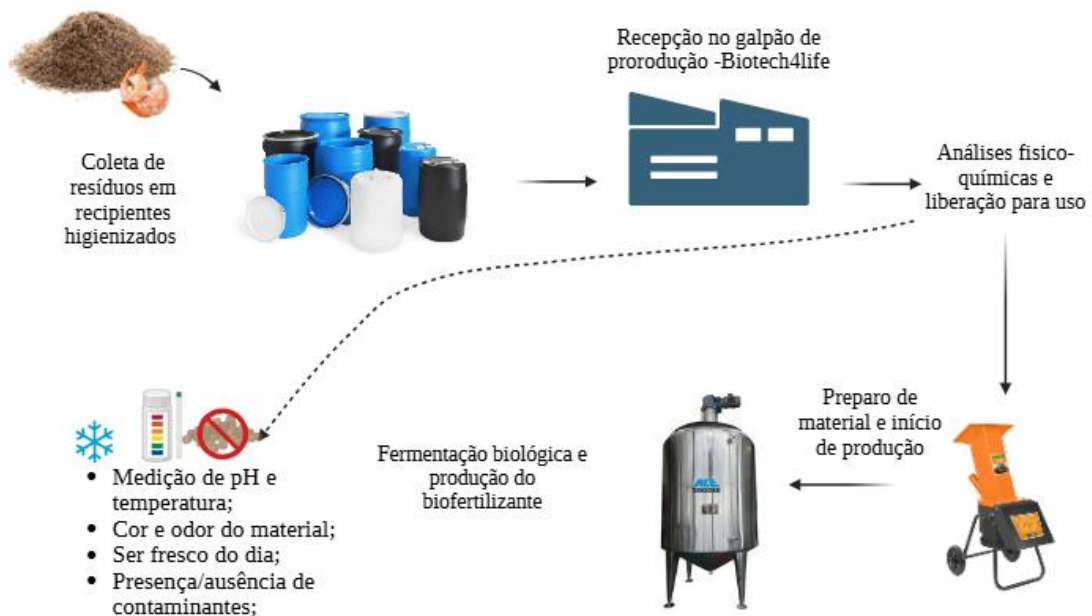
**Fonte:** Imagem criada pelo autor em: <https://www.biorender.com>.

#### 4.2 Obtenção e análise da matéria-prima

A matéria-prima (figura 7) foi obtida a partir de empresas parceiras do setor de beneficiamento de camarão da carcinicultura no estado do Ceará. O descarte dos resíduos é um desafio para esses produtores e como forma de benefício mútuo, é feito a coleta desses resíduos, que são utilizados como matéria-prima para a obtenção do biofertilizante. Para o tratamento da matéria-prima, foi estabelecido e padronizado características físico-químicas e tolerância de alguns contaminantes de acordo com o MAPA. Assim, ficaram estabelecidas as análises de pH

e temperatura do material, cor, odor, frescor, presença de outros resíduos e padronização de fornecedor.

**Figura 7:** Procedimento de captação de matéria-prima, análises organolépticas e físico-químicas da matéria na indústria de produção e preparo de equipamentos e materiais para a produção.



**Fonte:** Imagem criada pelo autor em: <https://BioRender.com>.

A coleta da matéria-prima ocorre em recipientes devidamente higienizados de acordo com o POP nº 02/v.01 2024 – Higienização de fermentadores e recipientes para processamento de resíduos, a partir de processo de lavagem com detergente neutro diluído, hipoclorito de sódio comercial diluído a 0,2%, seguido de álcool 70%, elaborado pela empresa.

A matéria-prima foi submetida aos testes de medição de temperatura e pH, é preferível que a temperatura chegue em torno de 13-20 °C, medida com termômetro manual e pH 6, medido por fita de indicador de pH, garantindo a boa qualidade do material, em seguida observa-se e registra-se informações organolépticas sobre a cor e odor, preferindo aspectos naturais e não escurecidos/oxidados, garantindo frescor, além disso, realiza-se a análise de presença e ausência de contaminantes externos como plásticos, outras carcaças, plantas ou qualquer outro objeto que possa afetar a qualidade do material.

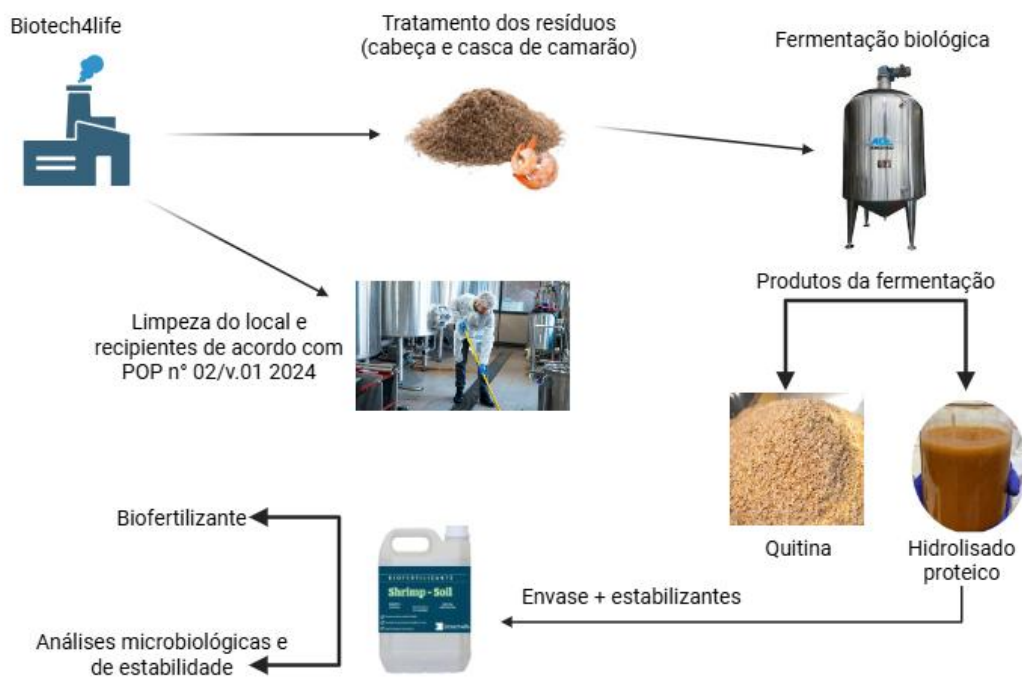
### 4.3 Monitoramento e análise do processo de produção

O monitoramento foi realizado desde a captação da matéria-prima, quando se fazem as análises de parâmetros de qualidade, e preparo do material, acompanhamento da fermentação, desmonte e higienização do local.

Antes de iniciar o processo, existe uma série de procedimentos operacionais padrão que são seguidos para higienização dos equipamentos. Os equipamentos e recipientes foram higienizados seguindo-se o mesmo protocolo POP n° 02/v.01 2024. Foi usado gás ozônio para esterilização do ar no local antes e depois da produção, para eliminação de fungos no ambiente. Durante o processo de fermentação, algumas condições são monitoradas como temperatura e pH inicial, após 24 h e após 48h de processo, além do rendimento final. Todos os dados foram registrados em planilhas para análise de desempenho da produção.

Durante o processo (figura 8), foram analisados pontos de melhoria contínua para otimização e garantia de qualidade do processo. Foi realizado a otimização do preparo dos resíduos utilizando trituração para melhorar a área de superfície de contato com os microrganismos, enzimas e ácido láctico. Além disso, após verificar a qualidade dos primeiros lotes produzidos, foram adicionadas etapas de separação a fim de garantir um produto final mais homogêneo, e seguro, livre de resíduos secundários e contaminantes externos.

**Figura 8:** Representação do processo de produção, limpeza e envase do biofertilizante pronto para comercialização, armazenado em temperatura ambiente.



**Fonte:** Imagem criada pelo autor em: <https://BioRender.com>.

#### 4.4 Análises do produto final

As análises para controle de qualidade do biofertilizante finalizado foram baseadas no Manual de Análises Microbiológicas de Alimentos e Água Silva *et al* (2017), com adaptações para o uso no biofertilizante, além da Instrução Normativa (IN) MAPA n° 61/2020, que estabelece procedimentos de validação para aprovação e comercialização. Dessa forma, para a padronização das análises microbiológicas e físico-químicas, foi realizado a criação de planilhas de controle de informação e procedimentos específicos para monitorar a qualidade final. Dentre esses procedimentos foram definidos: contagem total de microrganismos do produto assim que finalizado o envase (1° contagem), seguido de contagens mensais por pelo menos 3 meses, contagem de bolores e leveduras e, contagem de coliformes termotolerantes, além das análises físico-químicas da parte sólida do produto (quitina) como a análise de cinzas e de umidade, junto com uma análise por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e microscopia de fluorescência utilizando o corante CalcoFluor, específico para quitina, para garantir que a qualidade está de acordo com os requisitos.

Para a contagem total de microrganismos foi utilizado dois meios de cultivo, Agar, Triptona, Glicose, Extrato de leveduras (ATGE) para bactérias no geral e meio Man, Rogosa e Sharpe (MRS), seletivo para bactérias lácticas. Já para bolores e leveduras, foi utilizado o meio Ágar Sabouraud Dextrose com antibiótico cloranfenicol. Inicialmente foi retirado uma alíquota de 10 mL do biofertilizante no final do processo e adicionado em um Erlenmeyer contendo 90 mL de NaCl 0,9% devidamente esterilizada a 121 °C por 15 minutos, após isso, o frasco foi levado para agitação constante por 30 minutos para completa homogeneização. Após o tempo de homogeneização, foi realizado a diluição seriada em tubos Falcon contendo 9 mL de NaCl até a diluição  $10^{-7}$ , vale ressaltar que a diluição  $10^{-1}$  é o próprio Erlenmeyer contendo a solução, uma vez que essa diluição corresponde a proporção 1:9 das diluições seriadas. Foi retirado uma alíquota de 1 mL do Erlenmeyer e adicionado no Falcon com NaCl e em seguida agitado em vórtex para homogeneizar; o procedimento se repetiu para as subseqüentes diluições. Após isso, foi realizado o procedimento *spread plate*, onde foi feito a retirada de uma alíquota de 100 µL das diluições que serão contadas e espalhadas nas placas contendo os meios de cultura, utilizando uma alça de Drigaski, até secar completamente no meio, vale mencionar que os procedimentos são realizados em duplicata para padronização dos resultados. Após isso, as placas foram embaladas com papel filme e armazenadas na estufa incubadora por 48 h a 35 °C

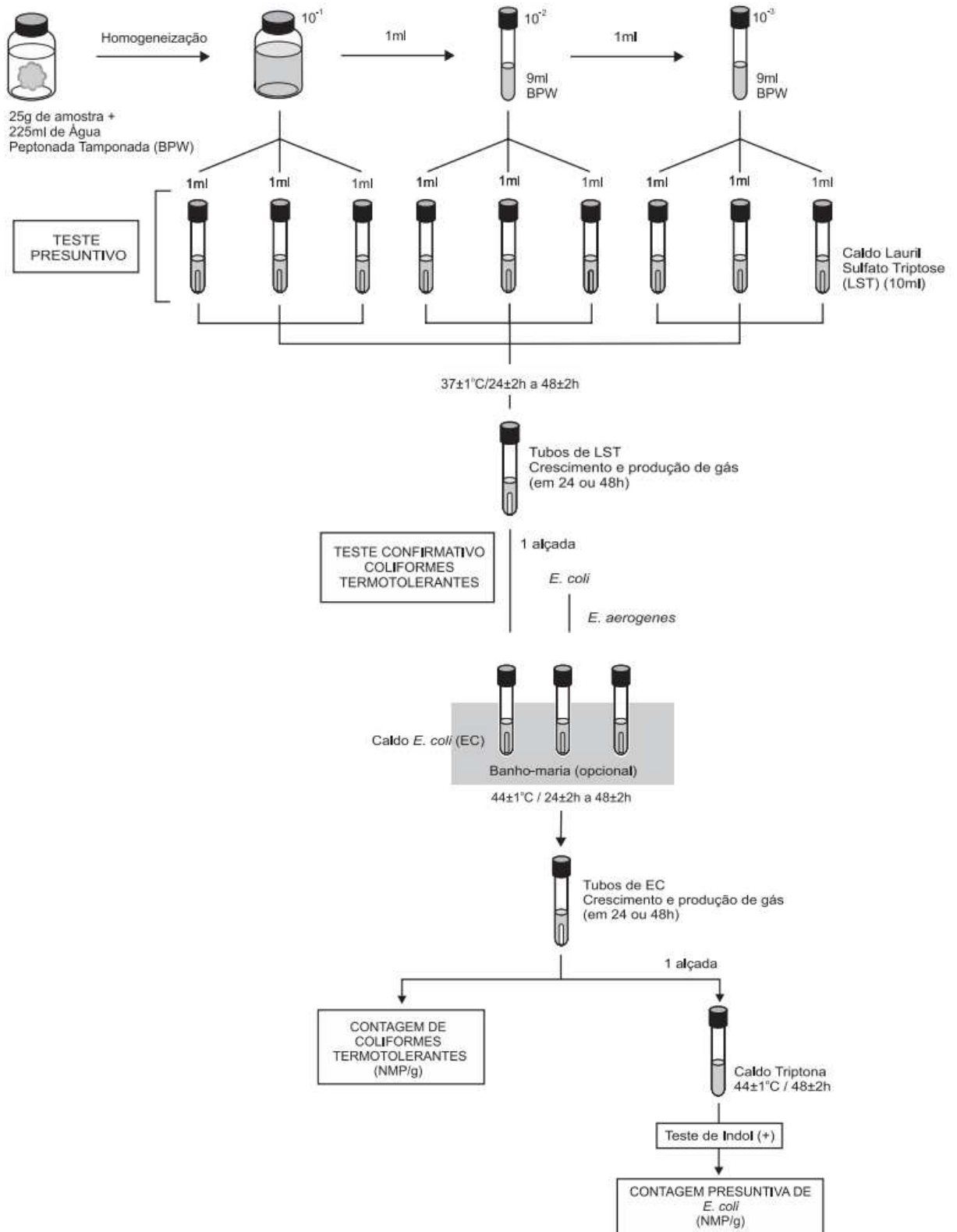
para contagem de bactérias totais e 72-120 h para bolores e leveduras. Após tempo de inoculação foi realizado a contagem das colônias e análise visual da presença e ausência de microrganismos não identificados, fungos e leveduras. Após isso, o material foi descartado e posteriormente descontaminado em autoclave a 121 °C por 30 minutos. O resultado das contagens foi registrado em planilhas e o procedimento foi repetido por 3 meses, após a primeira contagem, garantindo padronização dos resultados e garantindo a avaliação do tempo de vida das bactérias no biofertilizante.

Para a análise de coliformes termotolerantes, foi definido o uso de um material para testes rápidos, o uso de um substrato cromogênico Colilert, baseado no manual citado inicialmente, esse método visa identificar a presença de coliformes totais e *Escherichia coli*. Inicialmente foram separados 3 frascos Scott (um contendo 100 mL de água para controle negativo e dois contendo 90 mL de água para diluição do biofertilizante), esterilizados e prontos para análise, essa etapa não é preciso utilizar fluxo laminar, mas os procedimentos foram realizados no fluxo por padronização das atividades. Antes de usar o substrato, foi realizado a diluição do biofertilizante até  $10^{-2}$  para garantir a visualização do meio quando reagido com o Colilert. Segundo a descrição da metodologia, a diluição até  $10^{-2}$  não afeta o resultado, uma vez que o Colilert é um método rápido ultrasensível, podendo identificar até 1 colônia por UFC/mL, logo mesmo dando positivo o resultado estaria de acordo com a exigência das normas vigentes do MAPA, que exige um limite de no máximo 1000 NMP/g. São retirados 10 mL de amostra e adicionados ao primeiro Scott contendo 90 mL de água, agitado e em seguida retirados 10 mL do Scott 1 para o Scott 2, agitados manualmente, em seguida foi adicionado o substrato cromogênico e homogeneizado até completa dissolução do material, foi levado para estufa incubadora por 24h a  $35\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , também, foi adicionado um sachê do preparo no Scott contendo 100 mL de água estéril para o controle negativo. Após as 24 h, os frascos foram retirados e analisados visualmente, observando a presença e/ou ausência de uma coloração amarelada, sendo positivo para coliformes totais, após observação visual, os frascos foram levados para Câmara Escura com iluminação UV, para detectar a presença ou ausência de fluorescência, sinal confirmativo para presença de *E. coli* na amostra. O Colilert é indicado para ausência e presença, por ser rápido, preciso e sensível, na Biotech4life, se for detectado positivo no Colilert, é realizado a técnica padrão do NMP para avaliação do número mais provável e verificação se atende aos limites exigidos na normativa N° 61 do MAPA (1000 NMP/g de Massa seca). Apesar da tolerância permitida, na Biotech4life é obrigatório a ausência nos resultados.

A técnica do número mais provável (NMP), é um teste presuntivo que consiste na análise quantitativa do número mais provável de microrganismos em uma determinada amostra, inoculando alíquotas da amostra em vários tubos contendo o meio de cultura líquido específico. A determinação do número de microrganismos é baseada no princípio de que dividindo as amostras em alíquotas, algumas vão conter microrganismos e outras não, dependendo da quantidade presente na amostra. O número de alíquotas com microrganismos (tubos positivos) e alíquotas sem microrganismos (tubos negativos) permite estimar, por cálculo de probabilidade, a densidade original dos microrganismos na amostra (Silva *et al* 2017).

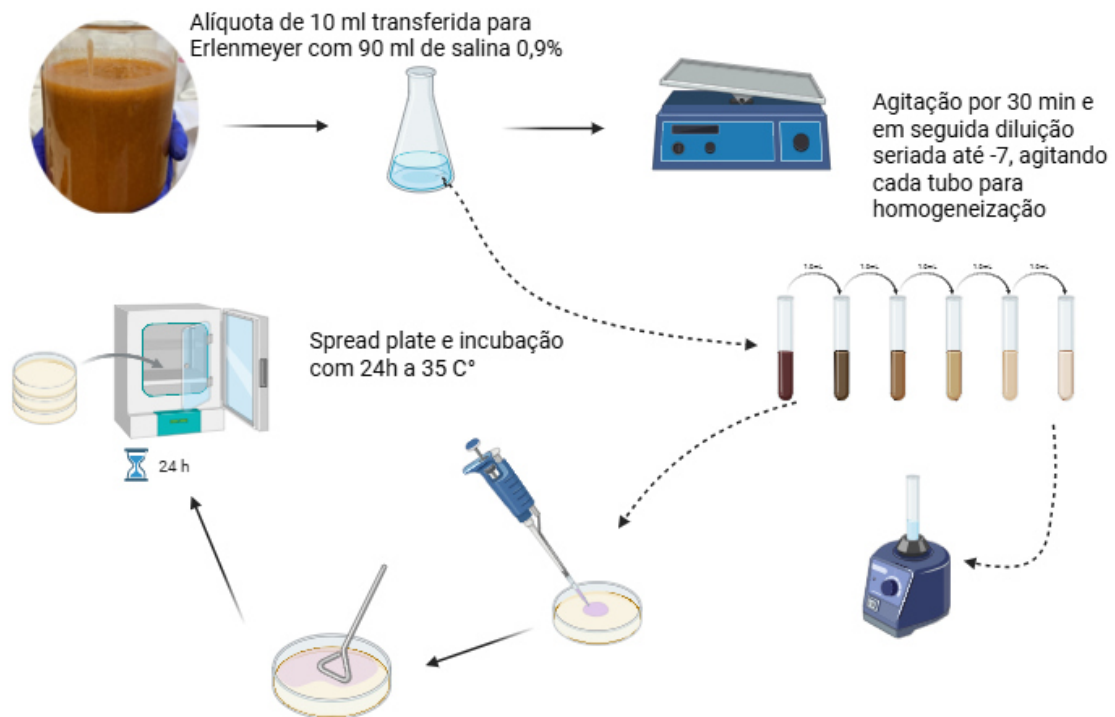
A metodologia de NMP (figura 9) utilizada é NMP ISO 7251:2005, que consiste em coletar 25 g ou 25 mL de amostra e adicionar em 225 mL de água Peptonada tamponada (BPW), homogeneizar e diluir três vezes,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ . Em seguida, é adicionado 1 mL da diluição em três tubos de ensaio com tubos de Durham contendo 10 mL de caldo Lauril Sulfato Triptose, que serão incubados por 24 h a  $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , e observados a formação de gás e mudança de cor, se positivo, parte para as próximas etapas, se negativo, os tubos são incubados por mais 24h nas mesmas condições. Após a formação de gás, é selecionado os tubos que deram positivos e transferido uma alçada de cada para tubos de ensaio com tubos de Durham contendo caldo *E. coli* (EC) e incubados em banho maria ou na estufa por 24 h a  $44\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ , observando se crescimento com produção de gás, testando positivo presuntivo para presença de *E. coli*. Após crescimento e formação de gás, testando positivo, de cada tubo positivo é transferido uma alçada para tubos de ensaio contendo 5 mL de Caldo Triptona 1%, para teste de indol, que são pré-aquecidos a  $44\text{ °C}$  antes da inoculação. Em seguida são incubados a  $44\text{ °C}$  por 48h e, após a incubação, adicionar 0,5 mL de Reagente de Kovacs para teste de indol a cada tubo. O desenvolvimento de um anel vermelho violeta na superfície do meio de cultura, após um minuto, indica a presença presuntiva de *E. coli*.

**Figura 9:** Esquema de análise de coliformes termotolerantes e *E. coli* presuntiva em alimentos pelo método de NMP ISO 7251:2005.



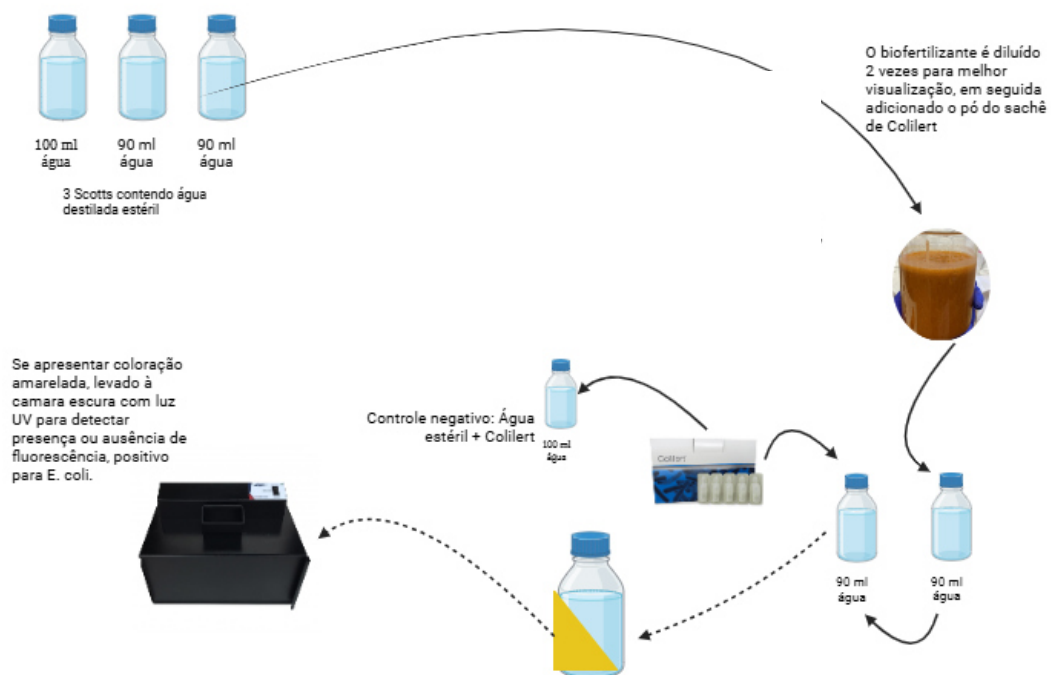
**Fonte:** Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água – Silva *et al* 2017.

**Figura 10:** Representação do procedimento de contagem de bactérias totais de bolores e leveduras do biofertilizante.



**Fonte:** Imagem criada pelo autor em: <https://BioRender.com>.

**Figura 11:** Representação do processo de identificação de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* por teste rápido Colilert.



**Fonte:** Imagem criada pelo autor em: <https://BioRender.com>.

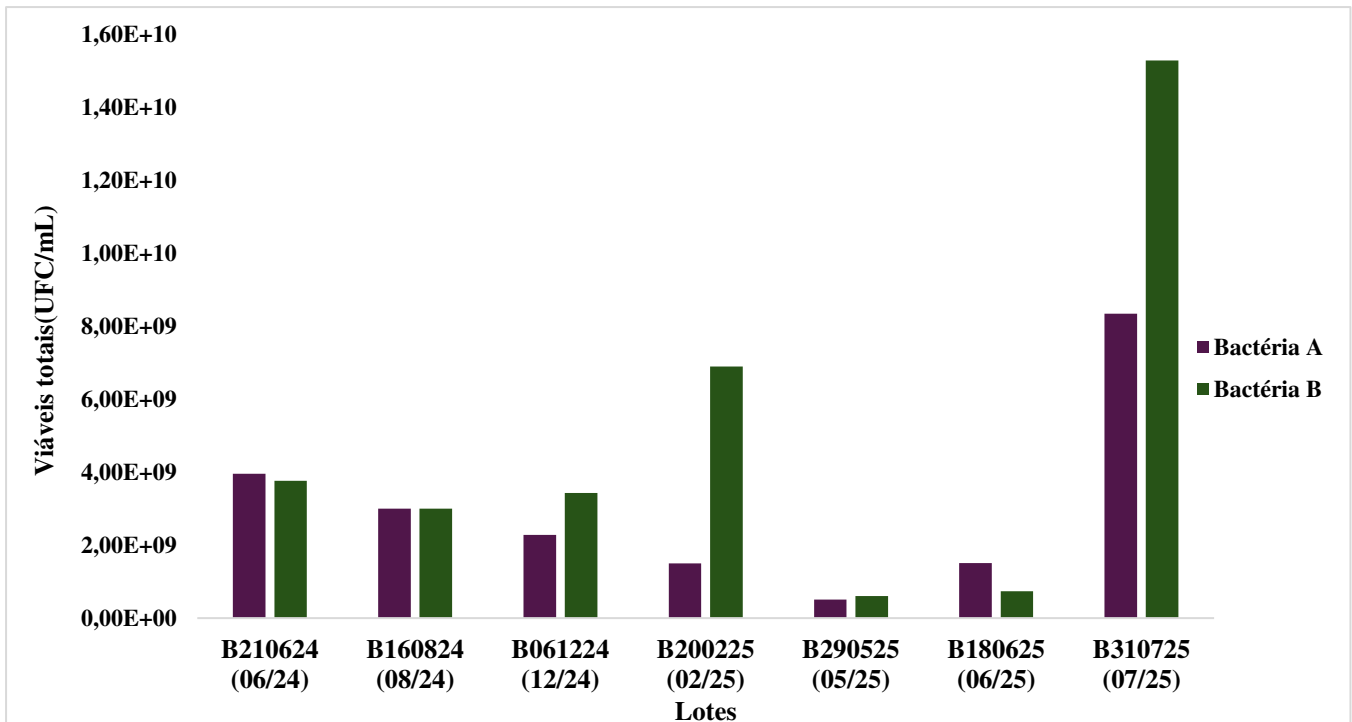
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A implementação e padronização do processo foi estabelecida, após a avaliação dos métodos e sua eficiência nas condições necessárias para contagem, armazenamento e utilização dos microrganismos baseando-se nos métodos apresentados por Silva *et al* (2017) no Manual de Análises Microbiológica de Alimentos e Água. Vale ressaltar, que a implementação e melhoria contínua ocorreu durante a realização das atividades, em acordo com a equipe da Biotech4life.

### 5.1 Análise e qualidade dos microrganismos - inóculo

De acordo com a figura 12, foi possível observar que a qualidade dos estoques armazenados foi garantida e os inóculos mantiveram seu crescimento no tempo estabelecido (24h), uma vez que se observou que a contagem de viáveis desses inóculos obtidos do estoque estavam estáveis após o tempo de armazenamento e livres de contaminantes, isso se dá principalmente por sua capacidade de produzir ácido lático, tornando o meio ácido e consequentemente impedindo o crescimento de outros microrganismos que não se mantem nessas condições, sendo uma característica estratégica na competição por nutriente e de interesse para processos industriais. Na figura 12, os inóculos dos lotes B290525 e B180625 tiveram sua contagem consideravelmente baixa em relação aos outros lotes devido à possíveis instabilidades de condições dos estoques, causadas por queda de energia e maior tempo de armazenamento. Por isso, padronizou-se utilizar um estoque com tempo de armazenamento de, no máximo 3 meses, em condições de -18 a -20 °C o que garante a qualidade e viabilidade do inóculo vindo desse estoque. Já os lotes B210624, B160824 e B061224 mantiveram um padrão adequado de crescimento. No lote B310725 foi possível observar um crescimento consideravelmente maior, isso se deu pela aplicação de um novo método de armazenamento testado, por ágar inclinado, onde foi possível observar que o crescimento foi melhor e mais rápido, levando a uma possível substituição do método anterior de estoque por formas mais estratégicas de armazenagem, ficando sugestivo um aumento padrão do tempo de estoque em relação aos lotes anteriores avaliados. Para todos os lotes, o limite mínimo de concentração celular necessário para garantir a qualidade do processo é de  $1 \times 10^9$  UFC/mL. Essa concentração celular garante vantagem competitiva das bactérias durante o processo fermentativo, bem como garante a produção adequada de ácido lático, reduzindo o pH do meio, o que contribui para hidrólise eficiente das proteínas contidas nas cabeças e cascas de camarão.

**Figura 12:** Contagem de células viáveis das bactérias lácticas utilizadas como inóculo no processo fermentativo de cabeças e cascas de camarão para cada lote produzido, divididos em meses de produção.



**Fonte:** Autor, 2025.

Embora existam diversos métodos eficientes para conservação e armazenagem de bactérias, além de meios para sua contagem (Freire *et al* 2021), alguns trabalham propõe o uso de glicerol 10% ou 20% como método mais atrativo para seu armazenamento na temperatura de 4 °C. Um trabalho publicado por Gulnar e Karligash (2014), testou o uso de 3 métodos tradicionais: em placa com meio sólido, usando óleo mineral e Glicerol 10%. Dentre os resultados, individualmente, os métodos apresentaram resultados semelhantes ( $1,1 \times 10^8$ ;  $1 \times 10^8$  e  $1,2 \times 10^8$ , respectivamente). No geral, utilizando diversas cepas foi possível observar que o uso de glicerol 10% teve melhor atividade microbiana (Gulnar e Karligash (2014). Apesar de não ter muito estudos testando diferentes métodos de armazenamento para bactérias, o uso do ágar inclinado e de solução contendo glicerol se tornou comumente mais utilizado por diversos motivos como praticidade, maior área de crescimento no ágar inclinado e possibilidade de se manter por mais tempo sob refrigeração, onde as bactérias conseguem ter nutrientes suficientes para se manter. Além de ser melhor para análises morfológicas, permitindo melhor visualização das colônias e de difícil contaminação por ser em tubos completamente fechados. Outras metodologias podem ser aplicadas, porém existem riscos de menor eficiência e necessidade da adição de outros componentes que protejam as células, como no caso da liofilização que apesar de ser uma boa técnica, pode promover a perda de características funcionais das células, quebra

de estruturas importantes, lentidão na sua recuperação e alto custo associado (Coulibaly *et al* 2018). Esse e outros fatores devem ser levados em consideração para garantir a qualidade dos inóculos como a temperatura, onde em temperaturas baixas, a estabilidade microbiana se mantém por mais tempo, temperaturas que variem entre 4 °C e 10 °C são ótimas para estabilidade e temperaturas entre -18 °C e 4 °C podem ser as melhores opções de armazenamento (Trisnawita; Silalahi; Sinaga, 2018).

## 5.2 Padronização e qualidade da matéria-prima

No Quadro 01, é possível observar as condições de dois lotes que foram produzidos antes da padronização dos fornecedores, esse resultado mostra o quanto a forma como esse material chega pode afetar e muitas vezes prejudicar todo o processo de fabricação e assim, perder a qualidade necessária exigida pela legislação vigente e pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que descreve a necessidade se estabelecer padrões mínimos de qualidade da matéria-prima, como pH e temperatura ideal.

**Quadro 01:** Parâmetros de qualidade da matéria-prima antes da padronização de fornecedor.

Lotes	T (°C)	pH	Aparência e odor
<b>B060224</b> <b>Fev de 2024</b>	<b>28,7</b>	<b>7</b>	<b>Não conforme</b>
<b>B040324</b> <b>Mar de 2024</b>	<b>26</b>	<b>6</b>	<b>Não conforme</b>

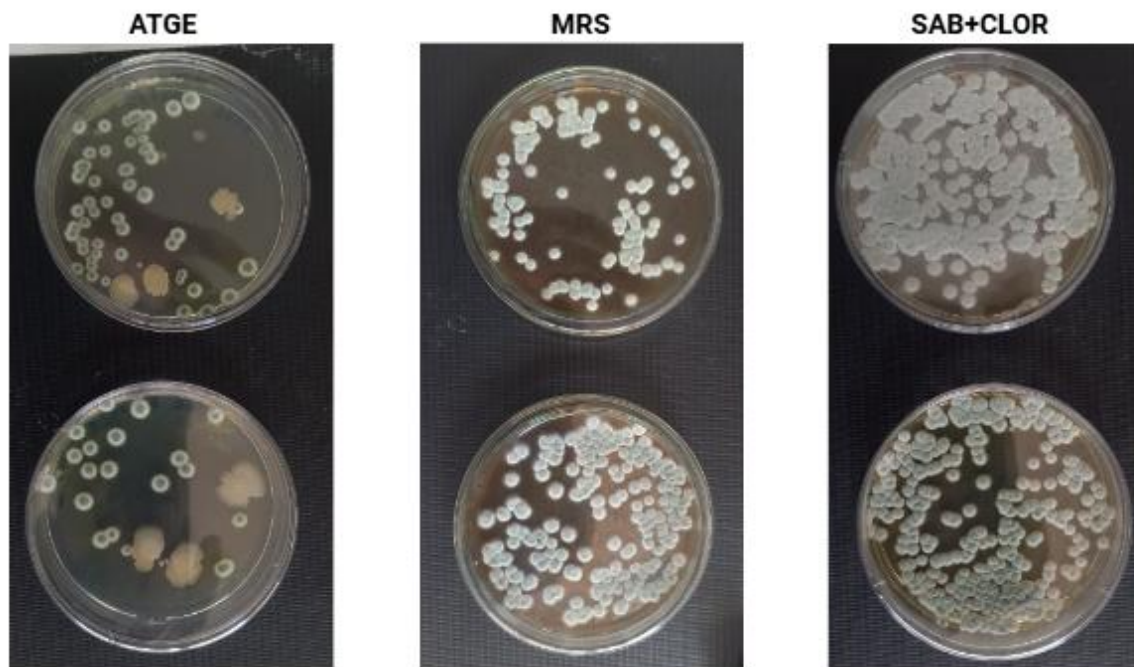
Fonte: Autor, 2025.

É possível observar que a temperatura dos lotes B060224 e B040324, fornecidos em fevereiro e em março de 2024, respectivamente, estão altas em comparação ao esperado (13 °C a 20 °C), o que consequentemente afetou sua aparência e odor, aparecendo um material mais escurecido, ou seja, oxidado, e de cheiro forte gerando desconforto, apesar do pH não ter variado do recomendado (6 – 7), essas condições foram resultantes de um material sem qualidade, com variedades de outros componentes e sujidades, além de não ser um material completamente fresco. Vale ressaltar que a padronização dessa temperatura esperada se dá principalmente pela necessidade de se obter uma matéria-prima fresca, e que evite a proliferação de outros microrganismos degradadores que tenham seu crescimento ótimo em temperaturas acima de 25 °C. Então, temperaturas abaixo de 20 °C garantem uma estabilidade maior da qualidade do material, sem perda de suas características organolépticas. Tais padronizações foram implementadas após acompanhar o processo de captação da matéria-prima e perceber não conformidades na qualidade de alguns fornecedores, padrões esses que

precisam estar em conformidade com critérios rígidos dentro da indústria do beneficiamento, que seguem legislações que garantam um produto seguro ao consumidor final.

As contagens de microrganismos viáveis mostraram o crescimento predominante de um fungo, que pode ter influenciado no crescimento de outros microrganismos normalmente detectados neste bioprocessamento. As análises microbiológicas demonstraram a presença de um fungo não identificado (figura 13) em todos os meios seletivos empregados. A ocorrência desse microrganismo indica contaminação, que pode ser associada à ausência de padronização no processo produtivo do fornecedor, evidenciada desde a etapa de captação da matéria-prima. O fungo em questão pode ter se proliferado na matéria-prima graças a ausência de procedimentos adequados na higienização e no armazenamento.

**Figura 13:** Contagem de células viáveis do Biofertilizante produzido a partir da fermentação láctica de resíduos do beneficiamento do camarão não conforme dos lotes de fevereiro e março de 2024, com padrões de qualidade estabelecidos para a recepção de matéria-prima.



\*ATGE – Meio Ágar, Peptona, Extrato de Levedura, Glicose; MRS - Man Rogosa & Sharpe; SAB+CLOR - Ágar Sabouraud com Cloranfenicol.

**Fonte:** Imagem criada pelo autor em: <https://BioRender.com>.

Já o Quadro 02 mostra o material após processo de padronização de fornecedor, onde foi possível observar o padrão de temperatura e pH semelhantes e aspectos organolépticos adequados conforme o estabelecido. Esse resultado junto da identificação da não conformidade e posterior implementação de melhoria contínua, se deu pelo processo de seleção de fornecedor

com garantia de qualidade estabelecido na indústria, advindo se um sistema de gestão padronizado, onde obtém material de um único local, estabelecem processos de higienização e descontaminação, além de outros procedimentos que prezam pela qualidade.

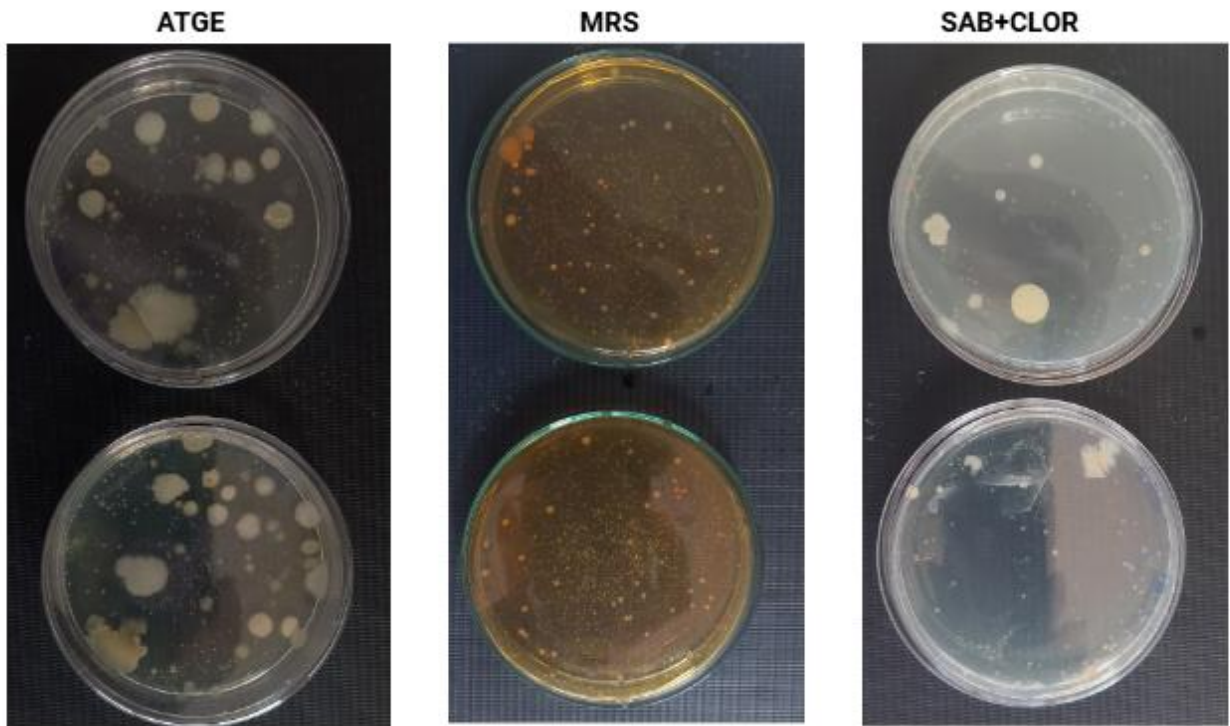
**Quadro 02:** Resultado dos parâmetros de qualidade da matéria-prima após implementação e padronização de fornecedor.

<b>Lotes</b>	<b>T (°C)</b>	<b>pH</b>	<b>Aparência e odor</b>
<b>B210624</b>	<b>13,1</b>	<b>6</b>	<b>Conforme</b>
<b>B160824</b>	<b>18,3</b>	<b>6</b>	<b>Conforme</b>
<b>B061224</b>	<b>21</b>	<b>6</b>	<b>Conforme</b>
<b>B200225</b>	<b>21</b>	<b>6</b>	<b>Conforme</b>
<b>B290525</b>	<b>17,5</b>	<b>6</b>	<b>Conforme</b>
<b>B180625</b>	<b>19,1</b>	<b>6,5</b>	<b>Conforme</b>
<b>B310725</b>	<b>17</b>	<b>7</b>	<b>Conforme</b>

**Fonte:** Autor, 2025.

Após a padronização do fornecedor, as contagens de microrganismos viáveis apresentaram melhora significativa – não estatisticamente - entre os lotes analisados. Observou-se o crescimento de colônias típicas, compatíveis com os microrganismos esperados nos meios seletivos utilizados, sem presença de contaminações fúngicas. As colônias detectadas foram características das cepas associadas ao processo produtivo, podendo ser derivadas tanto da matéria-prima padronizada, quanto do inóculo utilizado na formulação do produto.

**Figura 14:** Contagem do produto final após processamento com a padronização de fornecedor de matéria-prima livre de contaminação.



**Fonte:** Imagem criada pelo autor em: <https://BioRender.com>.

A presença de fungos nos lotes B060224 e B040324 sugere que houve uma falha em relação a uma ou mais etapas do processo, possivelmente na captação da matéria-prima em não conformidade, o que impactou diretamente no crescimento dos microrganismos e consequentemente no produto final. Um estudo feito Zhang *et al* (2025), explica como a contaminação por fungos pode alterar o microambiente do cultivo, promovendo competição por nutrientes essenciais, liberação de metabólitos inibitórios e modificação do pH, fatores que reduzem a qualidade tanto das bactérias do inóculo e consequentemente do produto. Ainda, alguns fungos possuem a capacidade de se adaptarem a ambientes em diferentes condições, sua presença pode provocar a produção de micotoxinas e enzimas hidrolíticas interferindo na capacidade de formação de colônias viáveis de bactérias (Zhang *et al* 2025). Em sistemas fermentativos, a qualidade matéria-prima é o fator primordial para qualidade microbiana, materiais de baixa qualidade ou contaminados acabam provocando variações nos lotes, redução de viabilidade celular e menor desempenho biológico para obtenção do produto final. Portanto, a contaminação mencionada nos lotes não padronizados pode ser resultado da qualidade indesejada da matéria-prima, além da necessidade de padronização de processos eficientes, a adoção das boas práticas de fabricação e conformidades com normativas que visam a segurança

e qualidade produtiva como a ISO 9001:2015 e ISO 22000. O mesmo serve para entender o resultado positivo após o processo de implementação de padrões de fornecedor e captação da matéria-prima com composição estável, no qual reduz a ocorrência de metabólitos indesejados e de microrganismos competidores, favorecendo o estabelecimento das cepas inoculadas e a manutenção da viabilidade celular ao longo do processamento. A presença predominante de colônias típicas nos meios seletivos utilizados indica que as condições de cultivo e manipulação do processo se tornaram mais adequadas após a padronização, garantindo um ambiente mais controlado e menos suscetível à contaminação por variações. Esses resultados estão em acordo com as normas ISO, que enfatizam a importância do controle de entradas de material, rastreabilidade e validação de processos, além de seu registro, como fatores determinantes para a qualidade do produto final.

De acordo com a IN nº 61/2020, a matéria-prima, independente de qual material seja precisa estar livre de contaminantes químicos e tóxicos que possam trazer algum risco ao consumidor final, assim, eles garantem a ausência de sujidade, local de armazenamento apropriado e temperatura dentro do padrão de durabilidade, de preferência que seja material fresco e limpo, além de estar livre de contaminantes como *Salmonella*. O processo de padronização e implementação dos métodos de qualidade da matéria-prima estão em conformidade com essa normativa que está voltada, principalmente para a produção de derivados de origem animal, vegetal e mineral, destinados ao seu uso na agricultura para benefício humano. Além disso as normativas internacionais ISO prezam pela segurança em todos os setores industriais, assim, a ISO 22000 e suas derivações tratam da importância da qualidade desse material seja de origem vegetal ou animal e que sua destinação final afete de forma significativa o ser humano, elas devem seguir processos de segurança, como estarem livres de patógenos ou qualquer composto químico que adultere sua conformidade, além de estabelecer um padrão de processamento desse material – fica ressaltado que essa abordagem padronizada é de obrigatoriedade apenas para empresas que buscam certificação nas normativas ISO's. Embora muitas instituições não sigam os padrões de normativas internacionais, as normativas nacionais existem com o objetivo de fiscalizar e proporcionar segurança ao consumidor final, com isso conclui-se a importância de padronização e implementação de métodos que sejam eficientes e seguros.

Ao comparar resultados obtidos antes e após a padronização de fornecedor, foi possível observar o impacto no produto final. A qualidade do produto formulado parte

fundamentalmente da qualidade que a matéria-prima chega até a indústria e padronizar e implementar métodos que garantam a excelência desse material é fundamental.

### 5.3 Padronização e melhoria contínua do bioprocesso

É possível no quadro 03 a implementação de parâmetros de acompanhamento do processo, divididos em 0, 24 e 48 h, verificando temperatura e pH. Esses fatores são essências para entender se a fermentação está acontecendo de maneira efetiva. Assim, no quadro, observou-se que os métodos implementados foram eficientes e garantiu a qualidade produtiva.

**Quadro 03:** Parâmetros estabelecidos pela empresa para monitoramento da produção, observando temperatura e pH que garantem a eficiência da fermentação láctica, além do rendimento final do biofertilizante após o bioprocesso.

Lote	Tempo (H)	Temperatura (°C)	pH	Rendimento (%) Biofertilizante
<b>B210624</b>	0h	13,1	6,00	87,00%
	24h	29,8	4,54	
	48h	28,0	4,35	
<b>B160824</b>	0h	18,3	6,00	89,50%
	24h	32,8	4,71	
	48h	28,7	4,43	
<b>B061224</b>	0h	21,0	6,00	85,20%
	24h	31,5	4,89	
	48h	28,0	4,37	
<b>B200225</b>	0h	21,1	6,00	90,00%
	24h	32,3	4,5	
	48h	28,6	4,1	
<b>B290525</b>	0h	17,5	6,00	90,60%
	24h	33,0	4,98	
	48h	29,6	4,33	
<b>B180625</b>	0h	19,1	6,5	87,00%
	24h	31,3	5,46	
	48h	29,8	4,39	
<b>B310725</b>	0h	17,0	7,00	98,00%
	24h	31,5	4,9	
	48h	28,3	4,42	

**Fonte:** Autor, 2025.

Observando as temperaturas iniciais é possível observar que se encontram dentro de um intervalo pré estabelecido, onde entendeu-se ser o ideal, garantindo que a matéria-prima que chegou estava nas condições padrão (entre 13 °C - 21 °C), em seguida é possível observar que durante o processo essa temperatura variou, elevando-se nas 24 h iniciais para valores acima

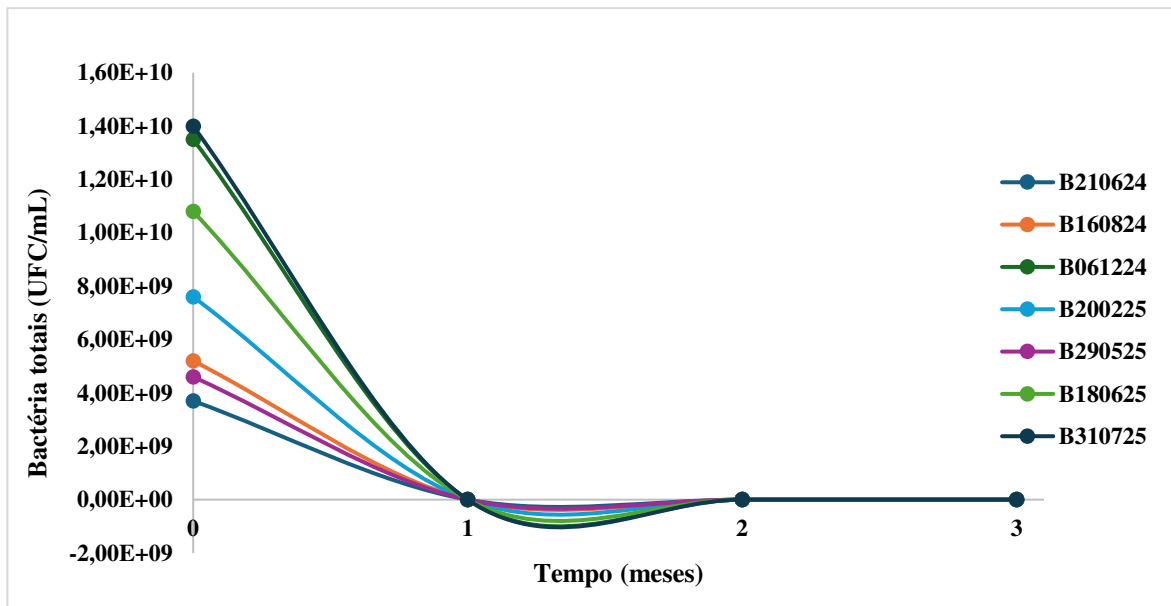
de 29 °C e em seguida decrescendo para valores entre 28 °C - 29 °C, se estabilizando após as 48 h de processamento.

Compreende-se o aumento da temperatura (quadro 3) por diferentes fatores, mas especialmente pela eficiência da fermentação láctica, onde ocorre a quebra do substrato pelas bactérias e conseqüentemente um alto gasto energético, liberando calor ao meio e assim elevando a temperatura, principalmente nas primeiras 24 h, onde ocorre um crescimento microbiano exponencial, já a queda da temperatura segue a mesma lógica de pensamento, uma vez que após às 48 h, todo substrato já está sendo consumido e conseqüentemente a quebra desse carboidrato é reduzido pela atividade microbiana que limita o gasto energético e reduz a temperatura no ambiente, ressaltando também que essa redução da temperatura está atrelado ao fato da produção de ácido láctico que em determinada acidez começa a reduzir a carga microbiana e conseqüentemente o número de bactérias no processo. Quando se observa a variação de pH (Figura 16), podemos compreender a mesma situação, no quadro vê-se que o pH inicial está em torno de 6 e nas 24 h seguidas há uma queda brusca para valores entre 3,5 e 4,5, resultado na fermentação láctica e geração do ácido láctico pelas bactérias, que vão produzir esse ácido como estratégia de inibição de outras bactérias deteriorantes e auxiliar na fermentação, onde o ácido láctico acidifica o meio e reduz o pH, como foi possível observar nos achados de Cira; Huerta; Shirai 2002 e Ximenes 2015, onde realizou um processo fermentativo semelhante e observou a queda do pH para valores na mesma faixa de comparação, confirmando assim a produção do ácido láctico para acidificação do meio a partir da fonte de carbono utilizada e as reações do ácido com o carbonato de cálcio presente da quitina, que pode ser removido em seguida por lavagem deixando a quitina livre, esses resultados justificam a acidez do meio após o processo fermentativo e é possível observar em diferentes resíduos como alimentos, feito em achados de revisão feitos por Admassie 2018 e no trabalho, com resíduos de camarão, de Ximenes 2015.

#### **5.4 Análise e qualidade do produto final**

Todo o fluxo de produção foi otimizado na implementação do controle de qualidade, que foi organizado nas planilhas de registro garantindo o monitoramento eficiente da produção, dos produtos e dos microrganismos envolvidos. O Gráfico (Figura 17) mostra o acompanhamento do controle de qualidade microbiológico do produto final de vários lotes, por três meses, isso se deu principalmente para garantir a reprodutibilidade do processo e melhorias a serem implementadas na produção.

**Figura 15:** Acompanhamento mensal dos lotes produzidos pela fermentação láctica dos resíduos do beneficiamento do camarão, pela contagem de viáveis ao longo de 3 meses, para verificar sua estabilização e presença de contaminações indesejadas.



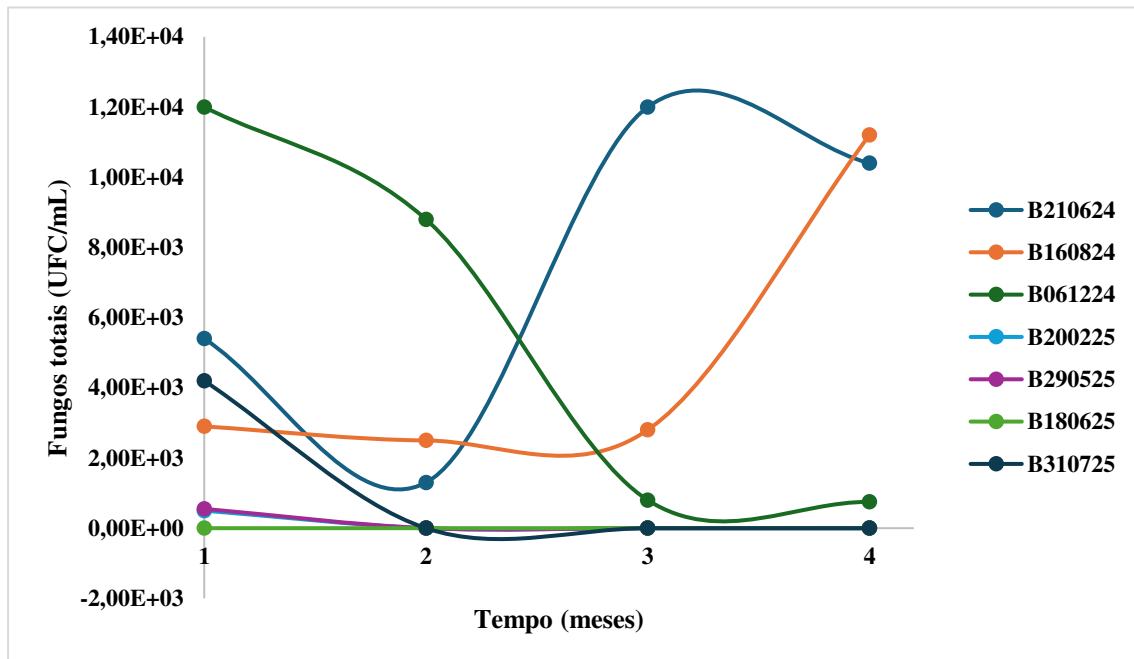
**Fonte:** Autor, 2025.

No gráfico é possível observar um declínio contínuo na contagem dos microrganismos, seguido de uma estabilidade após o segundo mês. Inicialmente as diluições para contagem varia entre  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$ , isso é justificado principalmente por ser uma contagem realizada logo após a finalização da produção, ou seja, o crescimento microbiano ainda está intenso, a partir do primeiro mês de contagem, as diluições decresceram para  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ , justificado por diversos fatores como a acidez do meio, contribuindo para dormência e morte celular. Por outro lado, essa queda na contagem de microrganismos totais é resultado da implementação de melhorias contínuas durante o processo, além da padronização de fornecedor de matéria-prima, implementação de Procedimentos Operacionais Padrão (POP's), inclusão de etapas de limpeza do ambiente, incorporação de sub-etapas que tornaram o produto final mais puro e livre de resíduos que consequentemente podem contribuir para um aumento microbiano, além do uso de estabilizantes que garantem maior tempo de prateleira, em acordo com a IN N°61 do MAPA. É importante destacar que a grande quantidade de microrganismo pode afetar de forma expressiva o tempo de prateleira e qualidade do produto, através de estufamento das garrafas pela produção de gás por parte dos microrganismos anaeróbicos ali presente, assim, o uso de estabilizantes se torna componente essencial da vida útil e garantia de qualidade do biofertilizante. Compreende-se, por tanto o quanto a implementação de métodos qualitativos nas etapas iniciais e do processo, junto com a estabilização do produto confirma a qualidade do

biofertilizante, sendo possível observar pelo resultado dos parâmetros monitorados e padronizados de acordo com o estabelecido.

No gráfico (Figura 16), podemos observar o comportamento da contagem de fungos totais, onde observamos um comportamento incomum, comparado ao de bactérias totais.

**Figura 16:** Contagem total de fungos em Meio Ágar Sabouraud Dextrose suplementado com Clorafenicol.



**Fonte:** Autor, 2025.

Nos lotes B210624 e B160824, de junho e agosto de 2024, foi observado que houve um crescimento fúngico significativo no decorrer dos meses avaliados, enquanto no restante dos outros lotes houve declínio e estabilidade da contagem. Isso levou a implementação de mais uma etapa na formulação do produto, acrescentando componentes estabilizadores visando maior resistência do produto à possíveis contaminações ambientais que possam ocorrer durante o envase. Assim, a melhoria contínua dos procedimentos operacionais padrão de higienização, resultam na inibição do crescimento de contaminantes. Vale ressaltar que esse comportamento não aconteceu nas bactérias totais, por possuírem características metabólicas diferentes ou serem menos resistentes ao ambiente ácido escasso de substrato de interesse.

Para detecção de coliformes totais, *E. coli* e *Salmonella*, todos os testes foram negativos, garantindo assim a segurança do produto para os clientes.

As bactérias utilizadas fazem parte de um grupo de BAL que se caracterizam por produzir ácido lático e que possuem condições de crescimento ótimas e pH's variando entre 3,5 a 10 e temperaturas que podem oscilar entre 13 °C a 37 °C segundo Abdel-Rahman, Tashiro e Sonomoto 2013 citado por Ximenes 2015. Semelhantemente, foi possível observar esse comportamento nesse trabalho, quando observamos a variação de pH final do produto e a variação da temperatura durante o processo, proporcionando um ambiente propício para as BAL fazerem a fermentação, logo em seguida, quando finalizado o processo e os produtos foram estabilizados, reduzem a quantidade microbiana por não ter mais substrato para produção de ácido lático e conseqüente o declínio de seu crescimento.

Além das contagens de viáveis totais de bactérias e fungos, outras análises importantes foram realizadas para compreender melhor a qualidade do biofertilizante, através da Instituto Campineiro de Análise de Solo e Adubo (ICASA), uma instituição certificada pela norma ISO/IEC 17025, cadastrada no MAPA, fazendo parte como requisito da IN N° 61, como mencionada anteriormente.

**Quadro 04:** Composição do biofertilizante analisado. \*Livre de patógenos

COMPONENTE	Lotes			IN 61 - MAPA
	210624	061224	200225	%
Carbono orgânico %	13,4	13,20	13,10	-
Nitrogênio livre %	1,60	2,20	2,18	-
Potássio %	0,15	0,18	0,19	0,1
Fósforo %	2,51	3,49	1,21	1
Materiais inertes %	0,00	0,00	0,00	0
Matéria orgânica %	80,67	79,14	84,81	-
Aminoácidos %	5,56	5,59	7,40	1
Relação C/N %	8,4	6,0	6,0	-

**Fonte:** Instituto Campineiro de Análise de Solo e Adubo (ICASA).

A composição básica do biofertilizante precisa possuir quantidades mínimas para ser caracterizado como tal. A IN N° 61 de 2020, garante que os biofertilizantes dessa categoria precisa possuir pelo menos 1% dos macronutrientes e micronutrientes principais como Nitrogênio, Potássio, Fósforo e Carbono, além de pelo menos 1% de aminoácidos livres para que possa formar uma base sustentável para atuar como biofertilizante. Além disso foram adicionados agentes estabilizantes conforme sugere a IN, uma vez que estes funcionam como

conservantes e prolongadores da vida útil do produto, mantendo suas funcionalidades e composição biológica, ressaltando que não traz prejuízo algum ao meio ambiente, nem gera fontes de poluentes a esses ambientes. Semelhantemente, a Quadro apresentada justifica as quantidades necessárias além do sugerido pela normativa, isso se dá pelo fato da riqueza em compostos essenciais que os resíduos possuem, além da excelência do processo fermentativo em extrair quantidades altas dessas moléculas, enriquecendo o hidrolisado e conseqüentemente o produto final. Em relação aos aminoácidos (quadro 05), a quantidade apresentada no biofertilizante está além do exigido pela IN, possuindo todos os aminoácidos essenciais como observado no quadro 05, logo isso se torna um destaque para a qualidade do produto e assim, podendo se configurar como um bioestimulador de plantas, também. Para registro e comercialização do produto, a IN N° 61 de 2020 exige que seja realizado todas essas análises de garantias de componentes como parte do processo de qualidade, garantindo assim, um produto confiável e rentável ao consumidor. Baseando-se na normativa, os resultados deste trabalho foram justificados em acordo com as exigências estabelecidas. A qualidade se deu principalmente pela implementação de métodos de qualidade, padronização do processo e melhoria contínua da produção, como mencionado nos tópicos anteriores.

**Quadro 05:** Composição de aminoácidos presentes no hidrolisado obtido a partir da fermentação láctica dos resíduos do beneficiamento do camarão.

ELEMENTO	QUANTIDADE (%)		
	Lote 210624	Lote 061224	Lote 200225
Ácido Aspártico	0,35	0,53	0,47
Ácido Glutâmico	0,86	0,63	0,27
Serina	0,15	0,14	0,21
Glicina	0,17	0,52	0,71
Histidina	0,09	0,18	0,26
Taurina	0,07	0,09	0,11
Arginina	0,36	0,61	1,06
Treonina	0,28	0,21	0,37
Alanina	0,57	0,51	0,67
Prolina	0,44	0,30	0,38
Tirosina	0,19	0,09	0,20
Valina	0,34	0,37	0,49
Metionina	0,10	0,15	0,15
Cistina	0,04	0,03	0,09
Isoleucina	0,30	0,30	0,39
Leucina	0,50	0,47	0,61
Fenilalanina	0,27	0,28	0,48
Lisina	0,54	0,16	0,38

Hidroxi prolina	<0,01 (LQ)	<0,01 (LQ)	<0,01 (LQ)
Triptofano	0,05	0,04	0,10
<b>Total de aminoácidos</b>	5,56	5,59	7,40

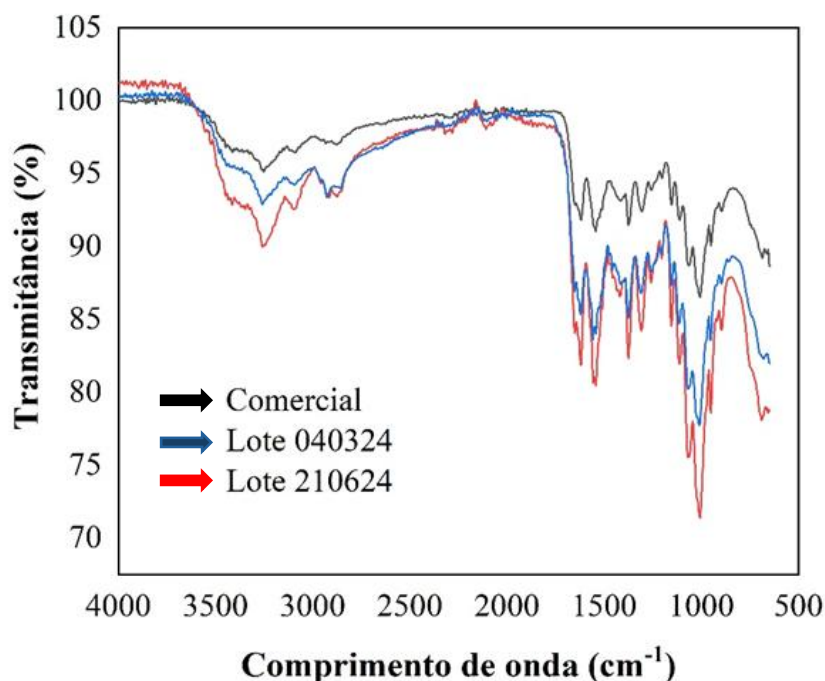
**Fonte:** Instituto Campineiro de Análise de Solo e Adubo (ICASA).

Um trabalho de revisão feito por Colla *et al* (2017), mostra como hidrolisados proteicos de origem vegetal são ricos nesses aminoácidos, que são fonte de alimentos para as plantas, além disso, esses hidrolisados possuem uma composição completa que atua no estímulo da microbiota da planta, tornando-a mais resistente aos estresses abióticos como salinidade, seca e ataque de predadores. Segundo o autor, essas características dos hidrolisados podem ser consideradas uma estratégia para a geração de plantas mais adaptadas e mais eficientes agronomicamente, principalmente por conseguirem captar mais nutrientes, terem mais fontes de carbono e nitrogênio, além do estímulo de fitohormônio. Ainda segundo os achados de Colla *et al* (2017), foi testado o uso desses hidrolisados para validar a hipótese de que esses produtos afetam diretamente a microbiota da rizosfera das plantas, e foi validado positivamente essa alteração nos microrganismos, estimulando-os e os tornando mais eficientes para as plantas. Semelhante ao que foi encontrado nos achados de Colla *et al* (2017), podemos justificar que hidrolisados provenientes de diferentes fontes de matéria-prima, que são tratados por processos microbiológicos fermentativos, podem possuir características semelhantes em relação a composição, que os tornam completos para uso na agricultura, como observado no trabalho em questão. Quando analisamos a composição de aminoácidos e de outros componentes, percebe-se o quanto essas moléculas são de grande valor nutritivo às espécies vegetais e podem ser um diferencial na hora da nutrição e destaque produtivo, cabe mencionar que essas características provenientes dos hidrolisados advindos desses processos microbiológicos podem ser configurar como bioestimuladores de plantas também, ou seja, esse produto gerado possui duas funções ricas de biofertilizar e bioestimular a planta e sua microbiota, ressaltando que o trabalho em questão mostra que o hidrolisado também possui micropartículas de quitina, que os tornam um diferencial comercialmente. Ressaltando que a quitina tem uma função importante no estímulo de maior captação de nutrientes e nutrição da microbiota do solo e das plantas.

Como a produção envolve o processo de geração de produtos de valor agregado, foi realizado também algumas análises físico-químicas da parte sólida obtida do processo, a quitina, fonte fundamental para a produção de quitosana para uso em diversas áreas industriais, desde alimentos à produção de medicamentos. Dentre as análises realizadas foram feitas

análises bromatológicas de Cinzas totais e Umidade, além de análise por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e microscopia de fluorescência utilizando o corante CalcoFluor, específico para quitina como vistos nas Figura 14 e Figura 15, respectivamente. Essas análises são essenciais para compreender como o processo de produção foi eficaz e o quanto as bactérias selecionadas conseguiram extrair as moléculas que geram valor ao produto.

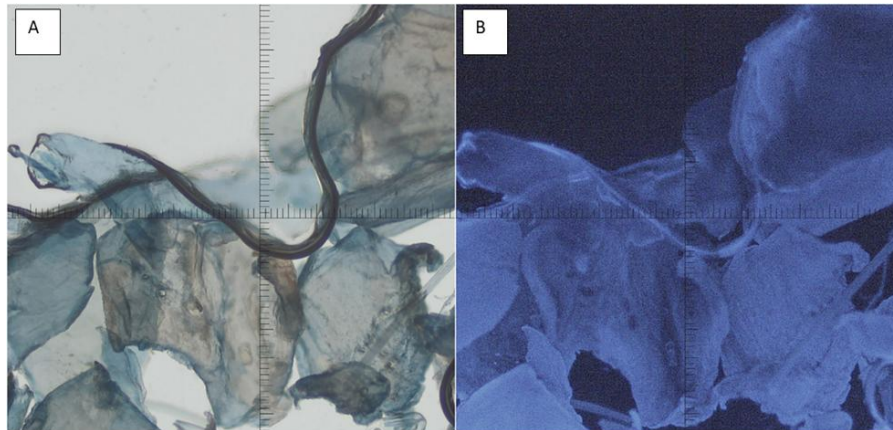
**Figura 17:** Espectros de infravermelho (FTIR) de dois lotes de quitina obtidos pelo processamento comparados à quitina comercial (Sigma), usada como referência.



O gráfico compara os resultados de análise entre a quitina obtida nos lotes selecionados e uma quitina comercial usada como referência. Os resultados apontam os picos semelhantes à quitina de referência, confirmando assim a qualidade durante o processo fermentativo de desproteinização que ocorre pela ação de enzimas proteolíticas da cultura utilizada no processo junto com proteases originárias presentes nos resíduos, e a desmineralização ocorrendo pelo processo fermentativo e atividade microbiana, o que resultou, também, positivamente na quantidade baixa de cinza, o que indica que o processo ocorreu de forma eficaz e com qualidade. Resultados semelhantes foram observados em estudos feitos por Robinson (2022), onde se comparou a pureza da quitina e quitosana também pelo método de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). As bandas de absorção da quitina podem ser mais nítidas na figura, devido sua maior cristalinidade. O espectro da quitina exibe bandas mais nítidas em comprimento de ondas próximas às vibrações de interação

de hidrogênios moleculares ( $3440\text{--}3260\text{ cm}^{-1}$ ); ( $2920$  e  $2870\text{ cm}^{-1}$ ); ( $1655\text{--}1660\text{ cm}^{-1}$  - Amida), além dos outros picos que são característicos da quitina.

**Figura 18:** Fotomicrografia de flocos de quitina corados com CalcoFluor, observados em microscópio de fluorescência com aumento de 50x. (A) Quitina corada com CalcoFluor, visualizada em campo claro. (B) Quitina corada com CalcoFluor, visualizada sob fluorescência, destacando a fluorescência característica do corante.



**Fonte:** Biotech4life soluções, 2024.

Na figura é possível observar a emissão de fluorescência que se dá devido ao uso do corante Calcofluor, que se liga às partículas de quitina presentes e emite essa fluorescência quando aplicado luz ultravioleta a 365 nm, confirmando assim a natureza pura da quitina, diferenciando-a de outros polímeros que possa existir ali. O uso desse corante é bastante interessante e mais utilizado principalmente por ser sensível e ligar-se a  $\beta$ 1-3 e  $\beta$ 1-4 polissacarídeo, presentes em quitina, por exemplo como observado nos estudos de Rasconi *et al* (2009), com uma análise preliminar do uso desse corante para detectar, identificar e quantificar parasitas fúngicos em fitoplanctons. Semelhantemente, podemos justificar o uso dessas análises para identificação da quitina pura, ressaltando que é necessário a abordagem de mais metodologias que possam auxiliar nesse processo de pureza e composição físico-química dessas partículas, como o uso de enzimas quitinasas, para observar o processo de degradação. A quitina é um produto gerado de alto valor agregado, principalmente por ser a fonte para a obtenção da quitosana, que é uma fibra importante para o uso da indústria, por ser maleável e capaz de formar biofilmes e cápsulas, bastante utilizados para medicamentos, além do uso da quitina na agricultura, que possui características atrativas para a microbiota edáfica, por exemplo.

Segundo um trabalho feito por Kielak *et al* (2012), que avalia o comportamento de comunidades de bactérias quitinolíticas, a quitina é destacada como um composto funcional na agricultura, principalmente por sua capacidade de induzir uma resposta de defesa nas plantas e

auxiliar as comunidades microbianas benéficas às cultivares. Além disso, ela atua como um bioprotetor, estimulando organismos do solo que auxiliam no controle de patógenos e na promoção de crescimento vegetal. Os microrganismos presentes no solo, possuem enzimas quitinases que transformam a quitina ali presente em fonte de carbono e hidrogênio, promovendo uma maior fonte de nutrientes para o solo e a planta tratada. Em concordância, a presença de micropartículas de quitina no biofertilizante e o uso da quitina sólida, possuem aplicações vantajosas na agricultura, estimulando tanto o maior desenvolvimento das espécies, quanto promovendo uma melhora nas comunidades microbianas do solo. Assim, apresentar um biofertilizante completo, rico em componentes estratégicos e uma quitina de qualidade, são fundamentais para a satisfação do cliente e eficiência do produto desenvolvido.

Em relação às características bromatológicas da quitina analisada, observou-se 10% de umidade, 5% de cinzas e 1% de proteínas.

O objetivo dessas análises é validar a qualidade do produto e do processo e atender de forma positiva as exigências dos órgãos regulamentadores, principalmente a Instrução Normativa N° 61 de 08 de julho de 2020 do MAPA – Ministério da Agricultura e Pecuária.

Biofertilizantes como alternativas à produtos químicos, além de serem mais rentáveis economicamente e sustentáveis, são produtos completos, como observado nas análises de composição, ricos em proteínas e aminoácidos que são essenciais ao crescimento das plantas e a produção de fitohormônios que estimulam o sistema imune delas. Dessa forma, entender o impacto que as BAL possuem é importante, quando observamos o quanto suas características metabólicas são interessantes e sua produção de ácido láctico como estratégia comercial para processos fermentativos.

Novas abordagens da fermentação estão sendo estudadas, principalmente no que se refere a potencialização do processo e aplicação de melhorias na produção. Perspectivas acerca da automação dos processos e sistematização do monitoramento de fatores na produção com temperatura e pH em tempo real a partir do uso de softwares desenvolvidos para esse procedimento são pontos que estão sendo avaliadas para projeções futuras. Essa ideia remete ao fato de tornar o sistema produtivo mais independente e prevenir perdas e não conformidades, uma vez que, assim, é possível observar a variação de fatores e/ou desconformidade do processo e prever o resultado final. O processo de transição para sistemas de economia circular é fundamental e necessário na agricultura, gerando menos impacto ambiental e valorização de

resíduos rico em componentes que trazem benefícios às plantas e, economicamente, aos produtores (Khanna, 2024).

Faz-se necessário novos estudos abordando o processo de fermentação láctica e biológica de maneira geral, muitos estudos na literatura são antigos e muitas vezes vagos, limitando a oportunidade de se conhecer novas metodologias e cepas com potencial fermentativo, principalmente em regiões características dessas bactérias. Ressalta-se também, a necessidade de novas publicações da aplicação desses produtos provenientes da carcinicultura com ação biológica na literatura, uma vez que a maioria dos trabalhos se referem à hidrolisados de peixe. Além disso, apesar das IN's não obrigar, é sugestivo aprofundar as análises de qualidade do produto final e das cepas utilizadas, buscando entender através análises moleculares como um maior rendimento pode ser obtido e como aumentar a eficiência das bactérias empregadas no processo. Estudos moleculares, como o sequenciamento do genoma e da expressão de genes metabólicos de interesse dessas cepas, possibilitam a oportunidade de se compreender melhor cada etapa do processo e como a melhoria contínua pode ser aplicada em todas as etapas que antecedem o resultado final.

## **6 CONCLUSÃO**

A avaliação e padronização dos métodos de análise utilizados no controle de qualidade foram alcançados e estabelecidos, garantindo a qualidade do biofertilizante. Além disso, os resultados garantiram a conformidade junto às normativas vigentes de segurança, qualidade microbiológica e físico-química. Foi possível avaliar criticamente os setores de captação de matéria-prima, produção, microrganismos e análises de qualidade, onde foram implementados os métodos de qualidade. O trabalho alcançou os objetivos e solucionou a problemática de entrega de um biofertilizante sem os padrões de qualidade exigidos pela legislação vigente.

## **7. PERSPECTIVAS FUTURAS**

A incorporação de técnicas moleculares representa uma estratégia promissora para o fortalecimento do controle de qualidade, oferecendo maior precisão na identificação microbiana e na detecção de contaminantes, contribuindo para processos cada vez mais seguros, eficientes e sustentáveis.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, Mohamed Ali; TASHIRO, Yukihiro; SONOMOTO, Kenji. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*, v. 31, n. 6, p. 877–902, nov. 2013. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.04.002.

ADMASSIE, Mesele. A review on food fermentation and the biotechnology of lactic acid bacteria. *World Journal of Food Science and Technology*, v. 2, n. 1, p. 19, 2018. DOI: 10.11648/j.wjfst.20180201.13.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR ISO 9001:2015**. Sistemas de gestão da qualidade — Requisitos. Rio de Janeiro: ABNT, 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR ISO/IEC 17025:2017**. Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT, 2017.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR ISO 22000:2019**. Sistemas de gestão da segurança de alimentos — Requisitos para qualquer organização na cadeia produtiva de alimentos. Rio de Janeiro: ABNT, 2019.

BIOFERTILIZANTE: um adubo líquido de qualidade que você pode fazer. [S.l.]: Embrapa, 2015.

BRASIL. Decreto nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004. Aprova o Regulamento da Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 14 jan. 2004.

BRASIL. Lei nº 6.894, de 16 de dezembro de 1980. Dispõe sobre a inspeção e a fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 16 dez. 1980.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes e corretivos*. [S.l.]: MAPA, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 13, de 24 de março de 2011. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 24 mar. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 27, de 5 de junho de 2006. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 27 jun. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 5 de agosto de 2009. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 5 ago. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 61, de 8 de julho de 2020. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 8 jul. 2020.

CARILLO, Petronia et al. Protein hydrolysates from animal or vegetal sources affect morpho-physiological traits, ornamental quality, mineral composition, and shelf-life of chrysanthemum. *Plants*, v. 11, n. 17, p. 2321, 2022.

CIRA, L. A.; HUERTA, S.; SHIRAI, K. Fermentación láctica de cabezas de camarón (*Penaeus* sp.) en un reactor de fermentación sólida. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, v. 1, n. 1–2, p. 45–48, 2002.

COLLA, Giuseppe et al. Biostimulant action of protein hydrolysates: unraveling their effects on plant physiology and microbiome. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, p. 2202, 2017. DOI: 10.3389/fpls.2017.02202.

COSTA, Magna Maria Macedo Nunes; BARROS, Maria Auxiliadora Lemos; FREIRE, Rosa Maria Mendes. *Biofertilizantes*. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2023.

COULIBALY, Ibourahema et al. Lyophilization (drying method) cause serious damages to the cell viability of lactic acid bacteria. *Annual Research & Review in Biology*, v. 24, n. 4, p. 1–15, 2018. DOI: 10.9734/ARRB/2018/39265.

DA SILVA, Fabio César. *Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes*. 2. ed. rev. ampl. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009.

DA SILVA, Neusely et al. Coleta, transporte e estocagem de amostras para análise. In: EDGARD, Blücher (org.). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água*. São Paulo: Blucher, 2017. cap. 1, p. 1–9.

DA SILVA, Neusely et al. Preparação de amostras para análise. In: EDGARD, Blücher (org.). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água*. São Paulo: Blucher, 2017. cap. 1, p. 11–28.

DA SILVA, Neusely et al. Técnicas básicas de contagem de microrganismos em placas. In: EDGARD, Blücher (org.). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água*. São Paulo: Blucher, 2017. cap. 3, p. 29–50.

DA SILVA, Neusely et al. Contagem de bolores e leveduras. In: EDGARD, Blücher (org.). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água*. São Paulo: Blucher, 2017. cap. 7, p. 87–106.

DA SILVA, Neusely et al. Contagem de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*. In: EDGARD, Blücher (org.). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água*. São Paulo: Blucher, 2017. cap. 9, p. 117–137.

DA SILVA, Neusely et al. Contagem de bactérias lácticas. In: EDGARD, Blücher (org.). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água*. São Paulo: Blucher, 2017. cap. 14, p. 209–227.

DA SILVA, Neusely et al. *Salmonella*. In: EDGARD, Blücher (org.). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água*. São Paulo: Blucher, 2017. cap. 19, p. 291–323.

DOMÍNGUEZ, Haizea et al. Fish viscera hydrolysates and their use as biostimulants for plants. *Sustainability*, v. 16, n. 20, p. 8779, 2024. DOI: 10.3390/su16208779.

DU JARDIN, Patrick. Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, v. 196, p. 3–14, 2015. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.09.021.

DZHAKIBAEVA, Gulnar T.; KEBEKBAEVA, Karligash M. Comparison of storage methods of lactic acid bacteria. *Journal of International Scientific Publications: Agriculture and Food*, v. 2, [s.d.].

ELYASS, Mona E. et al. Characterization and optimization of bacteriocin from *Lactobacillus plantarum*. *Open Journal of Applied Sciences*, v. 7, n. 3, p. 83–97, 2017. DOI: 10.4236/ojapps.2017.73008.

FERREIRA, Eduara. *Manual de análises de bioinsumos para uso agrícola: inoculantes*. Brasília, DF: Embrapa, 2024.

GARCÍA-SANTIAGO, Juana Cruz et al. Effects of fish-derived protein hydrolysate, animal-based organic fertilisers and irrigation method on grape tomatoes. *Biological Agriculture & Horticulture*, v. 37, n. 2, p. 107–124, 2021. DOI: 10.1080/01448765.2021.1891458.

GHORBEL-BELLAAJ, Olfa et al. Chitin extraction from shrimp shell waste using *Bacillus* bacteria. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 51, n. 5, p. 1196–1201, 2012. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2012.08.034.

HERNÁNDEZ, Martha Del Pilar López et al. Physicochemical and microbiological dynamics of the fermentation of cocoa material. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 41, n. 3, e-010, 2019. DOI: 10.1590/0100-29452019010.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6579-1:2017**. Microbiology of the food chain — Detection of *Salmonella* spp. Geneva: ISO, 2017.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 7218:2024**. Microbiology of the food chain — General requirements. Geneva: ISO, 2024.

KHANNA, Madhu et al. An economic perspective of the circular bioeconomy in the food and agricultural sector. *Communications Earth & Environment*, v. 5, n. 1, p. 507, 2024. DOI: 10.1038/s43247-024-01663-6.

KIELAK, Anna M. et al. Bacterial chitinolytic communities respond to chitin and pH variation in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, n. 1, p. 263–272, 2013.

LIN, Wen-Hsin et al. Viable counts and characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiology*, v. 23, n. 1, p. 74–81, 2006. DOI: 10.1016/j.fm.2005.01.013.

MADENDE, Moses; HAYES, Maria. Fish by-product use as biostimulants. *Molecules*, v. 25, n. 5, p. 1122, 2020. DOI: 10.3390/molecules25051122.

MANOEL, Edmar et al. Avaliação do cultivo orgânico de feijão caupi com aplicação de diferentes doses de biofertilizante. *Cadernos de Agroecologia*, v. 15, n. 2, 2020.

MARTINEZ-ROBINSON, Karla Guadalupe et al. Estudio fisicoquímico de quitina y quitosana obtenidas a partir del exoesqueleto de camarón café. *Biotechnia*, v. 24, n. 2, p. 28–35, 2022.

MCCARTHY, Aoife; O'CALLAGHAN, Yvonne; O'BRIEN, Nora. Protein hydrolysates from agricultural crops. *Agriculture*, v. 3, n. 1, p. 112–130, 2013. DOI: 10.3390/agriculture3010112.

MONNERAT, Rose et al. *Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero Bacillus*. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2020.

MORENO-HERNÁNDEZ, Jesús M. et al. Strategies for production, characterization and application of protein-based biostimulants in agriculture. *Chilean Journal of Agricultural Research*, v. 80, n. 2, p. 274–289, 2020. DOI: 10.4067/S0718-58392020000200274.

NUZHYNIA, Nataliia et al. Fish hydrolysates as potential biostimulants for growing legumes and cereals. *The Open Agriculture Journal*, v. 18, 2024. DOI: 10.2174/0118743315337010240830071253.

OLIVEIRA, André Luiz Martinez de et al. Aplicações da biodiversidade bacteriana do solo para a sustentabilidade da agricultura. *BBR – Biochemistry and Biotechnology Reports*, v. 3, n. 1, p. 56, 2014.

RAO, M. S.; MUÑOZ, J.; STEVENS, W. F. Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 54, n. 6, p. 808–813, 2000.

RASCONI, Serena et al. Use of Calcofluor White for detection, identification, and quantification of phytoplanktonic fungal parasites. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 8, p. 2545–2553, 2009. DOI: 10.1128/AEM.02211-08.

SILVA, Alineaura Florentino; PINTO, José Maria. *Preparo e uso de biofertilizantes líquidos*. [S.l.], [s.d.].

SILVA, Thiago Carvalho da et al. Papel da fermentação láctica na produção de silagem. *Pubvet*, v. 5, n. 1, 2011.

SOUZA, Gabriela Brito de et al. Potencial de uso do biofertilizante na agricultura: uma revisão integrativa. In: MENDONÇA, Moisés de Souza (org.). *Agronegócio e sustentabilidade: métodos, técnicas, inovação e gestão*. [S.l.]: Editora Científica Digital, 2021. p. 13–29. DOI: 10.37885/211106706.

SUN, Wenli et al. Amino acids biostimulants and protein hydrolysates in agricultural sciences. *Plants*, v. 13, n. 2, p. 210, 2024.

SZOPA, Daniel et al. Waste valorization towards industrial products through chemo- and enzymatic hydrolysis. *Bioengineered*, v. 14, n. 1, p. 2184480, 2023. DOI: 10.1080/21655979.2023.2184480.

WANG, Yaqi et al. Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 9, p. 612285, 2021. DOI: 10.3389/fbioe.2021.612285.

XIMENES, Júlio César Martins. *Biotransformação de resíduos da carcinicultura em produtos de alto valor agregado*. 2015.

ZHANG, Manyu et al. Bacterial–fungal interactions: mutualism, antagonism, and competition. *Life*, v. 15, n. 8, p. 1242, 2025. DOI: 10.3390/life15081242.